

**Universidad de San Carlos de Guatemala
Centro de Estudios del Mar y Acuicultura**

Informe Final

Práctica Profesional Supervisada



**Programa de vigilancia epidemiológica en especies acuícolas,
perteneciente a la Dirección Nacional de Salud Animal, DINASA, del
Ministerio de Desarrollo Agropecuario, MIDA, Ciudad de Panamá.**

Presentado por

Mayra Lorena Bailey Leonardo

**Para otorgarle el Título de
Técnico en Acuicultura**

Guatemala, Febrero de 2009

Universidad de San Carlos de Guatemala
Centro de Estudios del Mar y Acuicultura

Consejo Directivo

Presidente	M.Sc. Pedro Julio García Chacón
Coordinador Académico	M.Sc. Carlos Salvador Gordillo García
Secretario	M.Sc. Norma Gil de Castillo
Representante Docente	M.V. Salomón Medina Paz
Representante del Colegio de Médicos Veterinarios y Zootecnistas	M.Sc. Estrella de Lourdes Marroquín
Representante Estudiantil	T.A. Diana Crespo Mendoza
Representante Estudiantil	T.A. Manoel Cifuentes Marckword

Acto que Dedico

A Dios, por ser nuestro creador y darme el don de la vida.

A mis padres, quienes siempre me han apoyado durante todas las etapas de mi vida y a ellos les debo este nuevo éxito.

A mis hermanos, por ser siempre un apoyo.

A el resto de mi familia, por la ayuda que me han brindado.

A mis compañeros de promoción, ya que estamos compartiendo juntos este nuevo triunfo.

A mis amigos, quienes me han acompañado, apoyado y ayudado siempre que lo he necesitado.

Agradecimientos

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, por ser mi casa de estudios y permitirme hacer esta práctica bajo su nombre.

Al Centro de Estudios del Mar y Acuicultura, por ser mi escuela formadora de todos mis conocimientos.

A los Catedráticos del Centro de Estudios del Mar y Acuicultura, por trasmitirme su sabiduría.

Al Ministerio de Desarrollo Agropecuario, MIDA, por permitir realizar mis prácticas en dicho lugar.

Al Licenciado Lorenzo Becerra, por estar siempre al pendiente de mí durante todas mis prácticas.

A la familia Oreamuno Peralta, por tratarme con tanta hospitalidad y amabilidad y por considerarme una miembro más de la familia.

A la familia Tello, por recibirme y brindarme su apoyo.

Índice de Contenido	Página
1. Introducción	1
2. Objetivos	3
2.1. General	3
2.2. Específicos	3
3. Aspectos generales y administrativos de la Dirección Nacional de Salud Animal	4
3.1. Ubicación geográfica	4
3.2. Vías de acceso	4
3.3. Objetivo de la Dirección Nacional de Salud Animal	5
3.4. Funciones de la Dirección Nacional de Salud Animal	5
3.5 Organigrama de la Dirección Nacional de Salud Animal	9
3.6. Estructura de la Dirección Nacional de Salud Animal	9
3.6.1 Sub- Dirección de Salud Animal	10
3.6.2 Departamento de Vigilancia e Informacion Epidemiologica.	10
3.6.3 Departamento de Campañas Sanitarias	11
3.6.4 Departamento de Acreditación y Registros	12
3.6.5 Departamento de Laboratorio de Diagnóstico	13
3.7 Control del personal	15
3.8 Evaluación del personal	15
3.9 Prestaciones laborales	15
3.10 Políticas salariales y estabilidad del personal	15
3.11 Incentivos salariales	15
3.12 Servicios profesionales externos	16
3.13 Planificación	16

4. Aspectos determinados y/o específicos	16
4.1. Ministerios de Desarrollo Agropecuario	16
4.1.1 Visión	16
4.1.2 Misión	16
4.2. Dirección Nacional de Salud Animal	17
4.2.1 Visión	17
4.2.2 Misión	17
4.2.3 Objetivo	17
4.3 Unidad de Biología Molecular	17
4.3.1 Ubicación geográfica	17
4.4. Laboratorio de Residuos Tóxicos	18
4.4.1 Ubicación geográfica	18
• Normativo de bioseguridad de los laboratorios	19
4.5 Fincas visitadas por Inspección epidemiológica	22
4.5.1 Centro de Producción larval Farallón, S.A.	22
• Ubicación geográfica	22
4.5.2 Camaco, S.A.	23
• Ubicación geográfica	23
4.5.3 Truchas Bambito, S.A.	23
• Ubicación geográfica	23
5. Detección de agentes infecciosos causante de enfermedades en <i>Litopenaeus vannamei</i> a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	23
5.1. Virus de la Mancha Blanca (WSSV)	24
5.1.1 Rango geográfico	24
5.1.2 Generalidades de la enfermedad	25
5.1.3 Métodos de diagnóstico	25
5.1.4 Especies Afectadas	26
5.1.5 Signos clínicos	26

5.2. Síndrome de Taura (TSV)	27
5.2.1 Rango geográfico	27
5.2.2 Agente etiológico	28
5.2.3 Métodos de diagnóstico	28
5.2.4 Especies Afectadas	28
5.2.5 Signos clínicos	28
• Fase aguda	28
• Fase crónica	29
5.3 Enfermedad de la Cabeza Amarilla (YHV)	29
5.3.1 Rango geográfico	29
5.3.2 Agente etiológico	29
5.3.3 Métodos de diagnóstico	29
5.3.4 Signos clínicos	30
5.4 Virus de la Mionecrosis Infecciosa (IMNV)	30
5.4.1 Generalidades de la enfermedad	30
5.4.2 Rango Geográfico	30
5.4.3 Agente etiológico	30
5.4.4 Signos clínicos de importancia	30
5.5 Necrosis Hematopancreatítica (NHP)	31
5.5.1 Generalidades de la enfermedad	31
6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	31
6.1 Ácidos nucleicos	32
6.1.1 Ácido Desoxirribonucleico (ADN)	33
• Estructura del ADN	33
6.1.2 Ácido Ribonucleico (ARN)	34
• Estructura del ARN	35
6.1.3 Extracción de Ácidos Nucleicos	36
• Extracción de ADN para detección de virus de la Mancha Blanca con el método de Lysis Buffer	36

• Extracción de ADN para la Detección del virus de la macha Blanca con el método DTAB - CTBA.	38
• Extracción de ARN para la detección de virus causantes de las enfermedades de Cabeza Amarilla, Síndrome del Taura y Mionecrosis.	41
6.2 Oligonucleótidos	43
6.2.1 Tm de los oligonucleótidos	43
6.2.2 Temperatura de fusión (Tm)	44
6.3 Historia de la PCR	44
6.4 Principio de la PCR	45
6.5 Descripción	46
6.6 Aplicaciones de la PCR	48
6.7 Tipos de PCR	48
6.8 Variaciones de la PCR básica	50
6.9 Reactivos de la PCR	50
6.10 dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	51
6.11 ADN polimerasa	51
6.12 Electroforesis	52
6.13 Análisis de muestras	53
7. Norma ISO/IEC 17025 para la acreditación de ensayos	54
7.1 Descripción de la Norma	55
7.2 Adecuación a la norma el diagnóstico del virus de la Mancha Blanca	56
7.3 Procedimientos	56
7.4. Contenido de los procedimientos	56
7.5. Procedimiento de validación para un ensayo cualitativo	57
7.5.1 Validación	57
7.5.2 Parámetros a validar	57
8. Conclusiones	59

9. Recomendaciones	60
10. Bibliografía	61
11. Anexo	64

1. Introducción

Las unidades productivas pecuarias, para este caso en particular, las unidades productivas acuícolas por tratarse de seres vivos, los cuales están sometidos a manejos para la producción, son organismos que se encuentran constantemente amenazados por enfermedades particulares de la especie y además, como se pretende que el producto final sea para consumo humano, es necesario que reúnan las características de calidad e inocuidad para que estos sean aptos para el consumo.

Para un normal funcionamiento de las producciones y evitar que estas se vean afectadas por amenazas zoonositarias, se hace importante contar con un buen sistema de información y de vigilancia epidemiológica dentro de un marco integral, cuyo objetivo principal es prevenir, controlar y erradicar enfermedades de interés para estas unidades productivas, ya que a partir del conocimiento de la cadena epidemiológica que se establece entre el huésped, el agente causal y el ambiente se pueden generar estrategias para una detección temprana de enfermedades especialmente de altas difusión y generar una respuesta inmediata a la detección.

Un programa de vigilancia epidemiológica relaciona la bioexclusión y la biocontención de una enfermedad, es decir evita el ingreso de esta enfermedad, y la propagación de la misma.

Los programas de vigilancia epidemiológica han evolucionado por lo que se han visto obligados a implementar innovaciones tecnológicas, así como realizar campañas zoonositarias y simulacros de algunas enfermedades que afectan a los organismos acuícolas.

Una de las más grandes innovaciones efectuadas en los programas de vigilancia epidemiológica es la implementación de procesos de laboratorio, tales como la detección de agentes infecciosos en organismos acuícolas, peces y crustáceos principalmente, a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

El proceso de Reacción en Cadena de la Polimerasa consiste en la replicación del Ácido desoxirribonucleico, ADN, realizada a través de una enzima DNA polimerasa. Es de esta manera que se utiliza para la detección genómica de ciertos microorganismos patógenos como virus, ya sean ADN o ARN, y bacterias en muestras de camarones.

Durante la pasantía se realizaron visitas de inspección epidemiológica a fincas camaroneras y piscícolas, plantas procesadoras, se realizaron procesos de laboratorio principalmente PCR, para la detección de agentes patógenos en especies acuícolas.

2. Objetivos

2.1 General

Introducir al estudiante en el ejercicio de la carrera de Técnico en Acuicultura en una práctica directa, en un espacio institucional.

2.2 Específicos

- a. Proveer al estudiante de la oportunidad de participar en actividades reales propias de la Acuicultura.
- b. Retroalimentar el proceso de enseñanza, aprendizaje del estudiante, mediante la integración de los conocimientos y experiencias teórico prácticas adquiridas
- c. Propiciar el desarrollo y ejercicio de los valores morales y éticos del estudiante en el desempeño profesional.

3. Aspectos generales y administrativos de la Dirección Nacional de Salud Animal

3.1 Ubicación geográfica

La Dirección Nacional de Salud Animal, DINASA, es un departamento perteneciente al Ministerio de Desarrollo Agropecuario, MIDA, localizado en el distrito de Panamá, en el corregimiento de Tocumen, comunidad del Río Tapia.

Dentro de la Dirección Nacional de Salud Animal, se encuentran los laboratorios de Diagnóstico e Investigación Veterinaria “Dr. Gerardino Medina”, el laboratorio de residuos tóxicos y también el departamento de Sanidad Vegetal.

El laboratorio de Diagnóstico e Investigación Veterinarias cuenta con las siguientes unidades:

- Unidad de Microbiología
- Unidad de Patología
- Unidad de Parasitología
- Unidad de Serología
- Unidad de Control de Calidad
- Unidad de Residuos Tóxicos

3.2 Vías de acceso

Existen varias rutas para poder llegar a la Dirección Nacional de Salud Animal, siendo este un sitio muy accesible. La manera mas rápida de llegar es tomando el Corredor Sur, el cual pasa por el corregimiento de Paitilla, pasando a través de 2 cabinas de peaje, llegando hasta el Aeropuerto Tocumen. También se puede acceder a través de la vía Tumba Muerto.

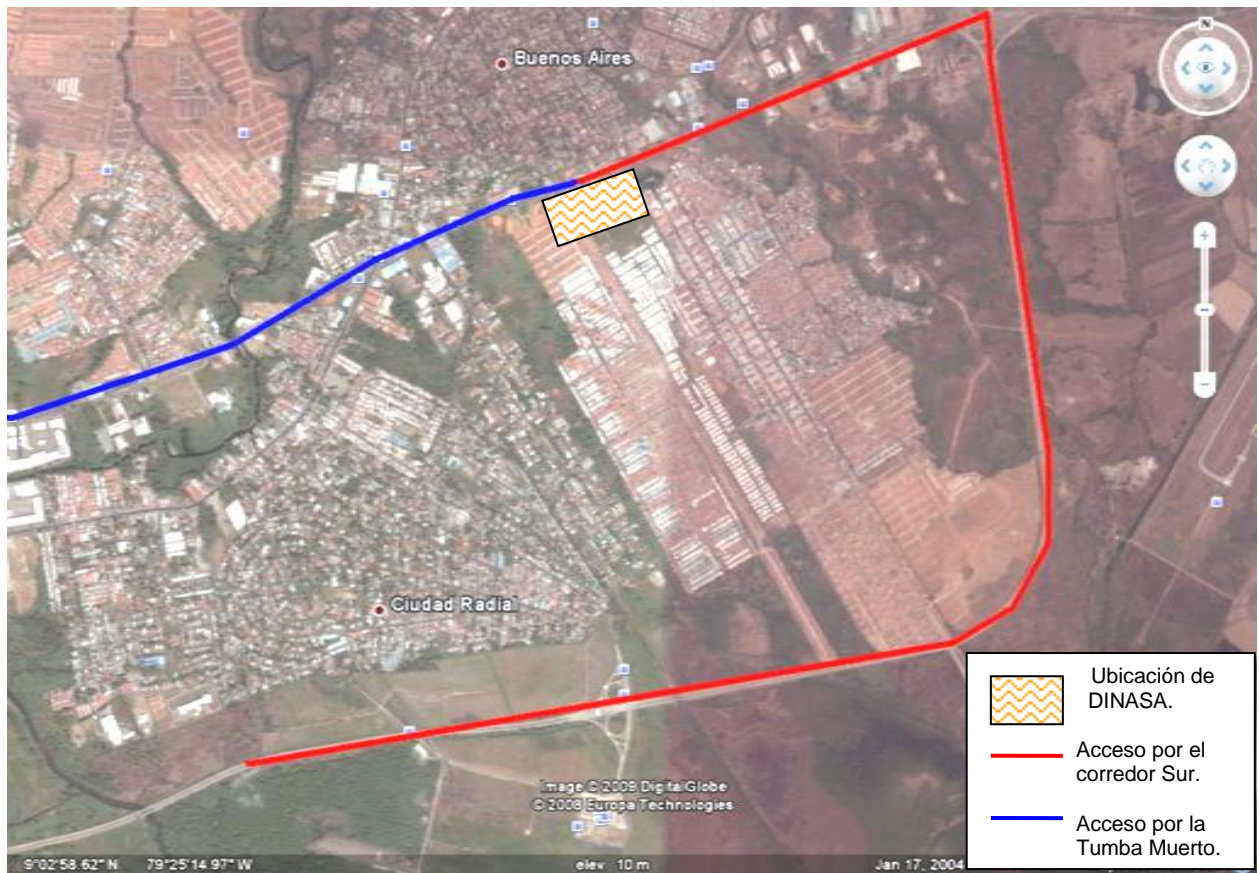


Figura No. 1: Vías de acceso a la Dirección de Salud Animal.

3.3 Objetivo de la Dirección Nacional de Salud Animal

Promover, normar y aplicar las medidas para la prevención, el diagnóstico, la investigación, el control y la erradicación de las enfermedades y/o plagas de los animales, a fin de proteger el patrimonio animal y coadyuvar en la salud pública y la protección ambiental. (Ministerio de Desarrollo Agropecuario, MIDA)

3.4 Funciones de la Dirección Nacional de Salud Animal

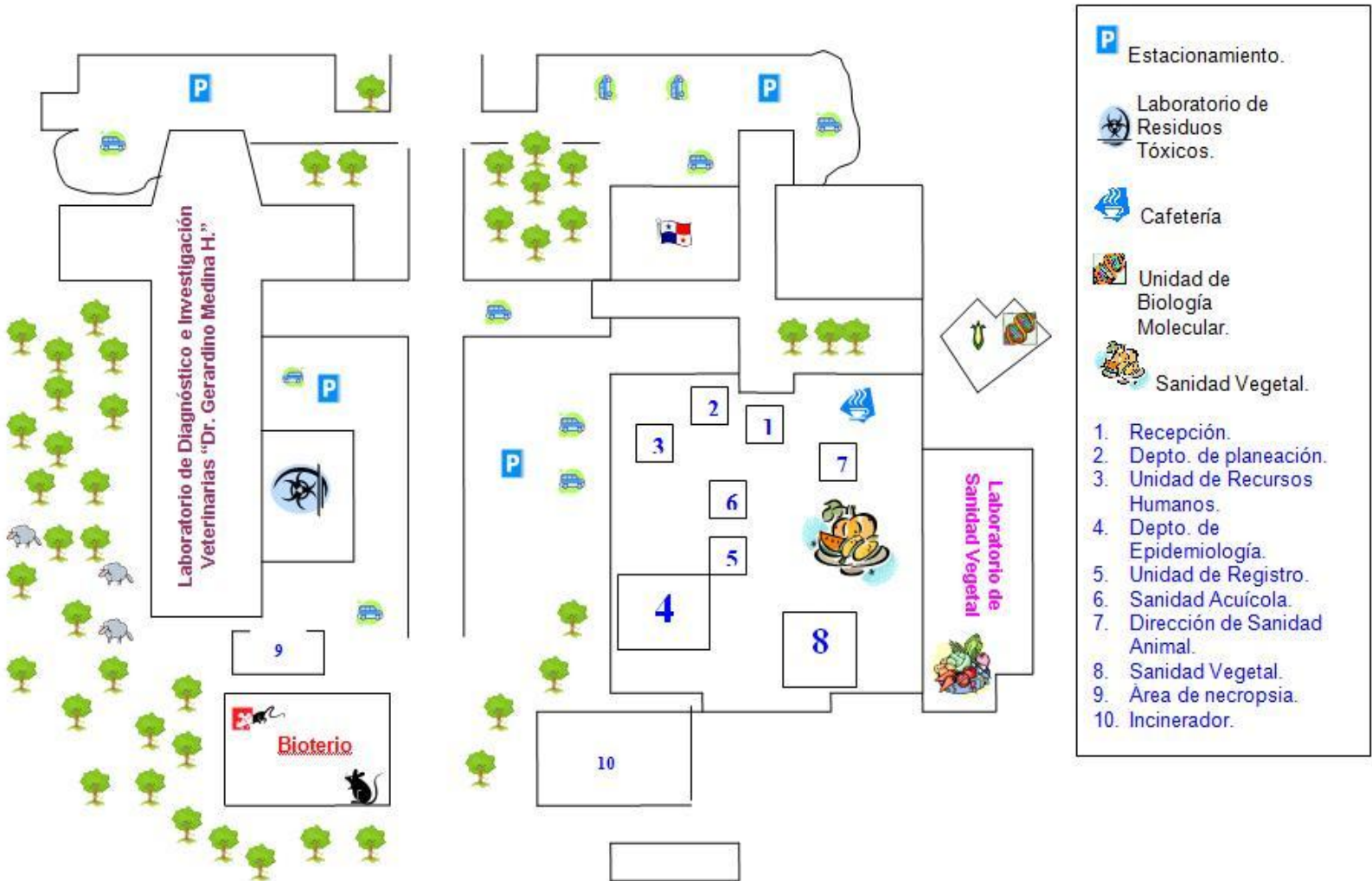
- Promover, fomentar, organizar, vigilar, coordinar y ejecutar, en su caso, las actividades en materia de salud animal, incluyendo aquellas en la que participen las

diversas dependencias de la administración pública, gobiernos provinciales, municipales y de corregimiento, así como particulares.

- Establecer las bases y parámetros que deberán seguir las normas de salud animal, así como la supervisión, verificación y certificación de su actualización y cumplimiento.
- Elaborar el listado para la acreditación de personas naturales y jurídicas en materia zoonosanitaria.
- Establecer requisitos zoonosanitario que deberán cumplir, para su introducción al país, los animales, productos y subproductos, así como los medicamentos para uso exclusivo de veterinaria, productos biológicos, bacteriológicos, químicos y alimenticios cuando sean para consumo y uso animal.
- Aprobar la elegibilidad, desde el punto de vista zoonosanitario, de zonas, países y regiones, para que exporten sus productos hacia Panamá.
- Proponer las normas en materia de salud animal para importación, exportación, tránsito y movilización de los animales vivos, así como supervisar y vigilar su cumplimiento.
- Proponer las normas en materia de salud animal para importación, exportación, tránsito y movilización de los productos y subproductos de origen animal; insumos para su uso, desechos y desperdicios cuando representen un riesgo para la salud de los animales, así como supervisar y vigilar su cumplimiento.
- Establecer, fomentar, mantener, coordinar y vigilar la operación de la infraestructura zoonosanitaria.
- Difundir permanentemente información en materia de salud animal.

- Autorizar la ubicación y operación de las explotaciones animales en zonas zoosanitaria de riesgo.
- Declarar zonas libres, zonas de control, zonas de escasa prevalencia, zona de erradicación y país libre de enfermedades y/o plagas de los animales.
- Establecer y operar un programa nacional de vigilancia epidemiológica, sustentado principalmente en el control de movilización de los animales y muestreos en plantas procesadoras y unidades de producción animal.
- Regular la utilización de los productos biológicos y biotecnológicos.

Figura No. 2: Croquis de la Dirección Nacional de Salud Animal.



3.5 Organigrama

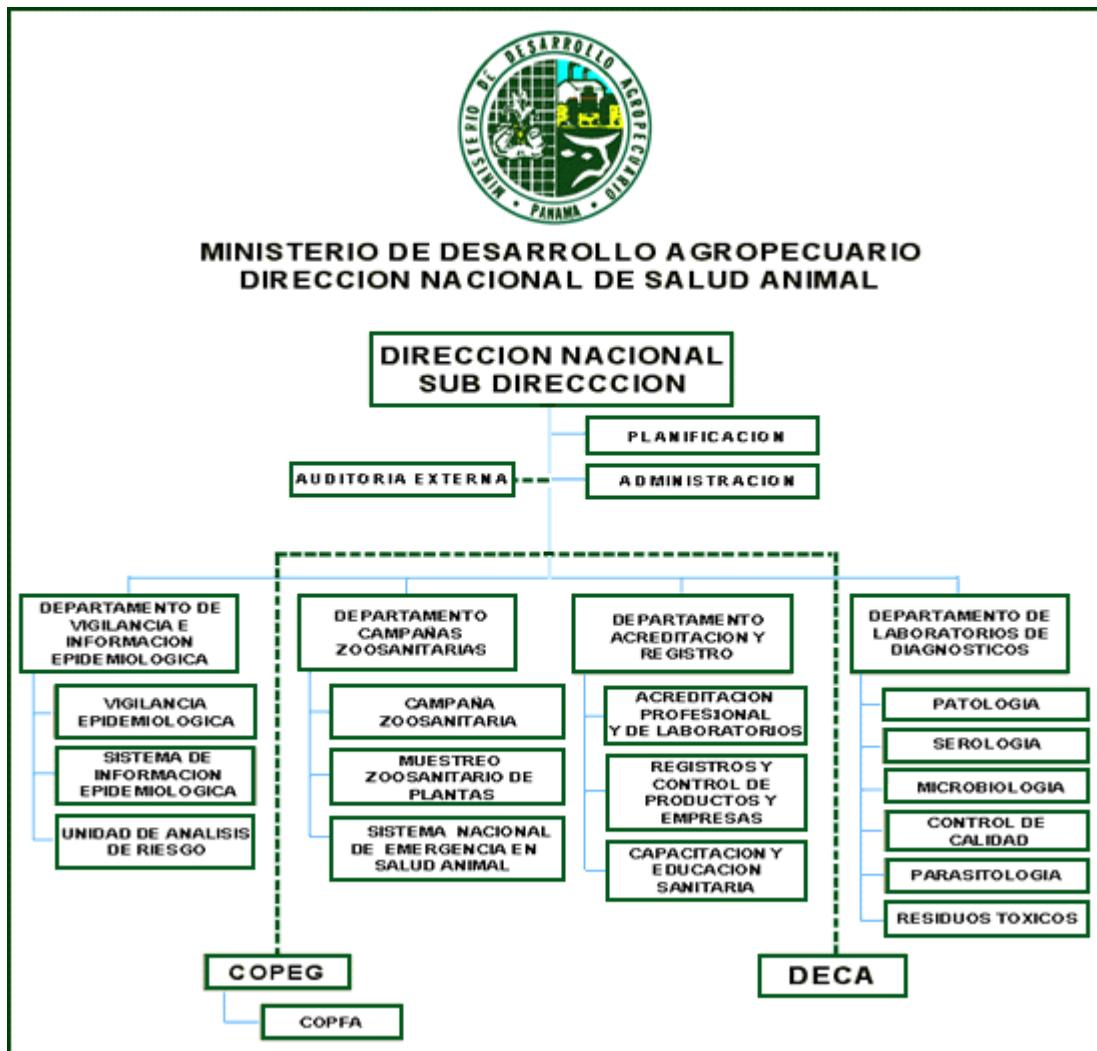


Figura No. 3: Organigrama de la Dirección Nacional de Salud Animal.

Fuente: www.mida.gob.pa

3.6 Estructura de la Dirección Nacional de Salud Animal

Como autoridad gubernamental de la Administración Veterinaria tiene la responsabilidad de garantizar la aplicación de las medidas zoonosanitarias y la ejecución de los procedimientos aplicables a las importaciones y exportaciones de animales, productos y subproductos de origen animal, apoyado en los Acuerdos y Normas nacionales e internacionales, para poder responder a las crecientes exigencias del comercio internacional y obtener la inocuidad de los alimentos a través de una eficaz seguridad sanitaria de los animales y la calidad de los productos de origen animal,

fortaleciendo de esta manera la protección de la salud humana y del ambiente. (Ministerio de Desarrollo Agropecuario).

3.6.1 Sub- Dirección de Salud Animal

Coadyuva en la ejecución de las funciones asignadas a la Dirección Nacional de Salud Animal, a través de la supervisión de las áreas técnicas y administrativas que operan bajo su responsabilidad y competencia, mediante la capacidad científico-técnica, observando una serie de principios y normas fundamentales de la salud animal, así como un esquema organizativo, aseguramiento de calidad y evaluación de las demandas de los productores y consumidores de los productos de origen animal, tanto en los mercados nacionales como en los internacionales, a fin de garantizar que los animales y productos de origen animal que se elaboren y comercialicen no constituyan un riesgo.

3.6.2 Departamento de Vigilancia e Información Epidemiológica.

Mantener vigente el sistema de captura, análisis y distribución de la información zoonosanitaria nacional e internacional, así como contar con la capacidad de efectuar análisis para la determinación del cálculo de Riesgo y, como base en todo ello, proponer alternativas de solución sobre problemas zoonosanitarios.

Dentro del departamento de Vigilancia e Información Epidemiológica se encuentran las siguientes secciones:

- Sección de Vigilancia Epidemiológica

Operar el sistema de captura y análisis de la información epidemiológica zoonosanitaria nacional e internacional para, en base en ello, proponer alternativas de solución sobre problemas zoonosanitarios de la ganadería nacional.

- Sección de Información Epidemiológica

Proporcionar un eficiente servicio de distribución de la información epidemiológica, de tipo zoonosanitario que genere el Departamento de Vigilancia e Información Epidemiológica, considerando entre los destinatarios, todas y cada una de las fuentes

de información, nacionales e internacionales, así como los diferentes grupos y organizaciones de: profesionales, productores, transportistas, industrializadores o comercializadores, relacionados con el Sector Pecuario Nacional.

- Sección de la Unidad de Análisis de Riesgo

Contar con la capacidad de evaluar, dentro de principios científicos, internacionalmente aceptados, la probabilidad de que enfermedades o plagas de los animales, puedan introducirse o difundirse en el país y del impacto que esto representaría para los sectores: productor, procesador o comercializador, que podrían resultar afectados.

3.6.3 Departamento de Campañas Sanitarias

Proporcionar elementos de juicio, que faciliten la planeación, ejecución y evaluación de las acciones gubernamentales y del sector Privado, tendientes a la prevención, control y erradicación, en su caso, de las enfermedades de importancia económica, cuarentenaria o zoonosológica, que afectan o puedan afectar a la población animal del país y controlar, a través de la operación de los instrumentos administrativos, el desarrollo de las campañas sanitarias oficiales.

- Sección de Campañas Zoonosológicas

Establecer los elementos técnicos y normativos, bajo los cuales se deben ejecutar las diferentes campañas sanitarias oficiales, y controlar desde el punto de vista administrativo el desarrollo y avance de las mismas, actuando como instancia evaluadora, de análisis y correctora durante el proceso.

- Sección de Muestreo de Plantas

Conformar y operar un eficiente sistema de verificación, detección y muestreo de animales, sus productos o subproductos, que permita detectar bajo parámetros de alta confiabilidad, el estado sanitario que guardan las poblaciones animales del país.

- Sección para la Coordinación del Sistema Nacional de Emergencia en Salud Animal

Mantener actualizado y en óptimas condiciones el sistema Nacional de Emergencia en salud Animal (SINESA), en orden de proteger la riqueza pecuaria del País ante la amenaza que representan las enfermedades animales de tipo exótico o emergencial, así como realizar acciones que permitan evaluar la eficiencia y eficacia de los Puntos de Control cuarentenario, interiores y exteriores del país, en la prevención de la introducción o diseminación de enfermedades de los animales.

- Sección de Sanidad Acuícola

Establecimiento de diseños de los muestreos epidemiológicos de enfermedades acuícolas y colecta de muestras; elaboración de formatos, manuales de procedimientos y normativas sanitarias acuícolas; así como capacitación de médicos veterinarios, vigilancia epidemiológica y demás actividades sanitarias a cumplir con los lineamientos internacionales a fin de garantizar el estado sanitario acuícola.

3.6.4 Departamento de Acreditación y Registros

Controlar y garantizar la calidad, de los servicios que, en materia de salud animal proporciona el MIDA en forma directa o a través de personas naturales o jurídicas para ello, así como de productos biológicos, farmacéuticos, quimioterápicos, desparasitantes, alimenticios y otros de uso veterinario que se expenden en el país, y de los establecimientos y plantas procesadoras ubicadas en el extranjero, que pretendan exportar animales, sus productos y subproductos, con destino a Panamá.

Este departamento esta compuesto por estas secciones:

- Sección de Acreditación Profesional y de Laboratorios

Establecer el sistema técnico-administrativo para la incorporación, seguimiento y control de los profesionales idóneos, personas jurídicas y laboratorios, que sean acreditados por el MIDA, para ejecutar las campañas sanitarias o para prestar servicios privatizados.

- Sección de Registro y Control de Productos y Empresas

Controlar y garantizar la calidad de los productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso y consumo animal; así como de las empresas que los produzcan o comercialicen, a través del establecimiento y operación del sistema técnico - administrativo para el registro y control de dichos productos y empresas.

- Sección de Capacitación y Educación Sanitarias

Buscar la excelencia en la calidad de los servicios prestados por el MIDA, en el área de salud animal, a través de la capacitación y actualización del personal de la dirección Nacional y/o de los profesionales idóneos, acreditados y, mediante programas de educación sanitaria, dirigidos a los sectores de la comunidad relacionados con la producción pecuaria, lograr una mejor comprensión y aceptación de las labores realizadas por la dirección Nacional.

3.6.5 Departamento de Laboratorio de Diagnóstico

Proporcionar un confiable servicio natural, para el diagnóstico de las enfermedades de los animales; la constatación de la calidad de los productos para uso animal y la detección de residuos tóxicos, que de soporte a las labores responsabilidad del MIDA en el área de Salud Animal y apoye la productividad del sector pecuario.

Se encuentran las siguientes secciones:

- Sección de Patología
- Sección de Microbiología
- Sección de Parasitología

Contar con la capacidad de diagnosticar las enfermedades animales, con base en las técnicas de diagnóstico parasitológico, en apoyo a las campañas zoonosanitarias oficiales y para promover la estandarización y capacitación en el uso de dichas técnicas

oficiales, cuando deban ser utilizadas en otros laboratorios de diagnóstico, sean estos oficiales o acreditados.

- Sección de Serología

Aplicar las técnicas de diagnóstico serológico, en apoyo a las campañas zoonosanitarias y para promover la estandarización y capacitación en el uso de dichas técnicas oficiales, cuando deban ser utilizadas en otros laboratorios de diagnóstico, sean estos oficiales o acreditados.

- Sección de Constatación del Control de Calidad

Contar con la capacidad de aplicar el aseguramiento de la calidad, incluidas las de constatación, en los químicos, biológicos, farmacéuticos, alimenticios y otros de uso en animales, que se produzcan, importen o comercialicen en el territorio nacional para dictaminar sobre su calidad, eficacia e inocuidad desde el punto de vista zoonosanitario y para promover, en su caso la estandarización y capacitación en el uso de dichas técnicas oficiales, cuando deban ser utilizadas en otros laboratorios, específicamente autorizados para ello por el MIDA, sean estos oficiales o acreditados.

Garantizar una oportuna provisión de animales de laboratorio de alta calidad, para la realización de pruebas biológicas tanto por Sección, como por las demás secciones o departamentos de la Dirección Nacional de Salud Animal.

- Sección de Residuos Tóxicos

Contar con la capacidad de aplicar las técnicas para la determinación de la presencia de residuos tóxicos, de acuerdo con las normas internacionales, en los productos y subproductos de origen animal destinados a consumo humano, sean estos importados o destinados a la exportación.

3.7 Control del personal

La Dirección Nacional de Salud Animal, mantiene un control de personal mediante tarjetas y un lector de huellas digitales. La hora de entrada al trabajo es a las 7:30 marcándolo en la tarjeta y la hora de salida es a las 15:30.

En caso de que algún trabajador no pueda presentarse por incapacidad, ya sea por enfermedad o accidente, este debe de informarle a su superior la razón por la que no puede asistir al trabajo, el jefe le dará el tiempo de reposo de acuerdo a la gravedad de su condición. Para solicitar un permiso de ausencia, este debe ser notificado por escrito un día antes de la misma, justificando la razón de su ausencia.

3.8 Evaluación del personal

El Ministerio de Desarrollo Agropecuario, realiza un procedimiento de evaluación del desempeño del nivel técnico del personal que contrata antes de obtener el trabajo y durante del mismo.

3.9 Prestaciones laborales

DINASA-MIDA, cuenta con un departamento de bienestar social el cual se ocupa de todas las gestiones de los trabajadores tales como: Seguro medico correspondiente a la Caja del Seguro Social (CSS), comedores y cafeterías dentro de la institución, recreaciones en días festivos, etc.

3.10 Políticas Salariales y estabilidad del personal

Las políticas salariales van de acuerdo a la jerarquía de mando, de acuerdo sus atribuciones, funciones y al nivel académico. Desglosándose a partir de un Director General, hasta trabajador de campo, personal administrativo y de apoyo.

3.11 Incentivos salariales

Los trabajadores de DINASA-MIDA, reciben su salario cada quincena, también cuentan con prestaciones por ley, retiro, jubilación y vacaciones, por cada 6 meses de trabajo, se da 1 semana de vacaciones. El empleado decide cuando toma sus vacaciones.

3.12 Servicios profesionales externos

El MIDA no contrata servicios profesionales externos. Sin embargo si se reciben asesorías periódicas para áreas técnicas en los laboratorios como:

- Laboratorio de Biología Molecular
- Laboratorio de Bacteriología de Alimentos
- Laboratorio de Residuos tóxicos

También se reciben consultorías en las áreas de diagnóstico, entre las cuales se encuentran las consultorías internacionales realizadas por A&M USDA-FSIS, Texas, Estados Unidos.

3.13 Planificación

El ministerio cuenta con un departamento de planificación para la Dirección Nacional de Salud Animal.

4. Aspectos determinados y/o específicos

4.1 Ministerio de Desarrollo Agropecuario

4.1.1 Visión

Contribuir a mejorar la competitividad de los productores, mediante el aumento de los rendimientos y la reducción de costos, dinamizar el empleo y ayudar a disminuir la pobreza rural. (Ministerio de Desarrollo Agropecuario, MIDA).

4.1.2 Misión

Un sector próspero, competitivo, rentable y sostenible que contribuya a generar desarrollo para el país, aumentar el empleo y elevar la calidad de vida de los panameños y panameñas, en especial de la familia rural.

4.2 Dirección Nacional de Salud Animal

4.2.1 Visión

Ser una institución sostenible y dinámica, operada con los óptimos estándares y normas nacionales e internacionales que garantiza excelencia del nivel de protección zoonosanitaria para seguridad alimentaria, económica y competitiva de los productores.

4.2.2 Misión

Garantizar la protección de servicios, aplicación de tecnología y de un sistema de normas y controles zoonosanitario que permite una protección pecuaria sostenible y competitiva.

4.2.3 Objetivo

Promover normar y aplicar las medidas para la prevención, el diagnóstico, la investigación, el control y la erradicación de las enfermedades y/o plagas de los animales, a fin de proteger el patrimonio animal y coadyuvar en la salud pública y la protección ambiental.

4.3 Unidad de Biología Molecular

4.3.1 Ubicación geográfica

La unidad de Biología Molecular se encuentra dentro del Laboratorio de Diagnóstico e Investigación Veterinaria, "Dr. Gerardino Medina H.", en la Dirección de Salud Animal, DINASA, perteneciente al Ministerio de Desarrollo Agropecuario, MIDA.

RECEPCIÓN

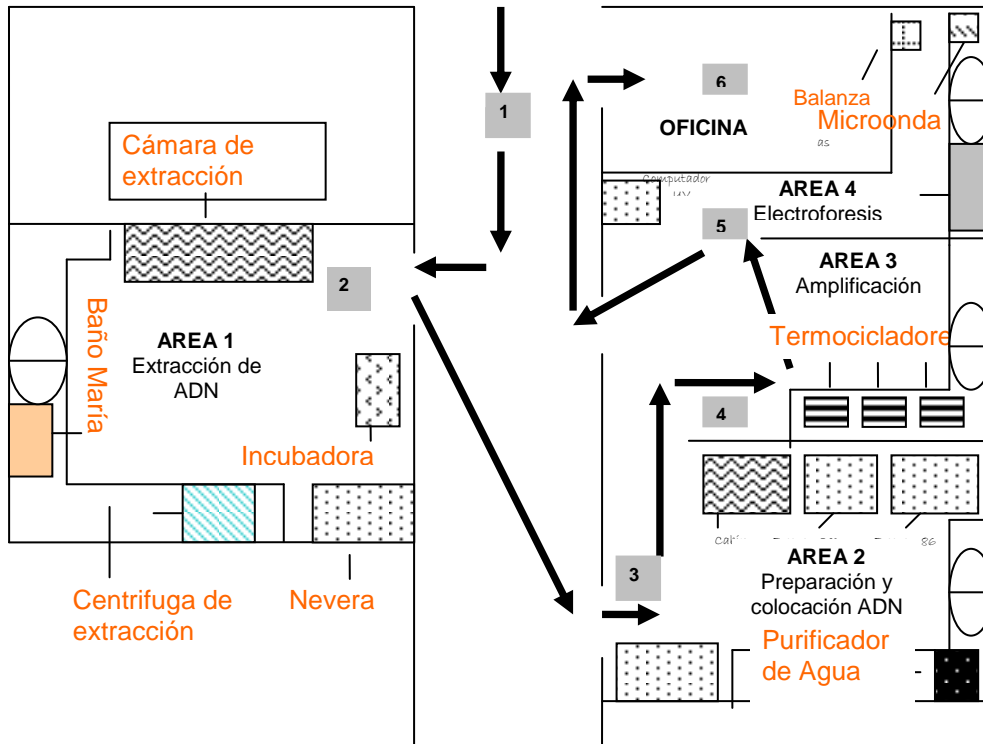


Figura No. 4: Croquis de la Unidad de Biología Molecular

4.4 Laboratorio de Residuos Tóxicos

4.4.1 Ubicación geográfica

El Laboratorio de Residuos Tóxicos se encuentra localizado dentro del Laboratorio de Diagnostico e Investigación Veterinaria, "Dr. Gerardino Medina H.", en la Dirección de Salud Animal, DINASA, perteneciente al Ministerio de Desarrollo Agropecuario, MIDA.

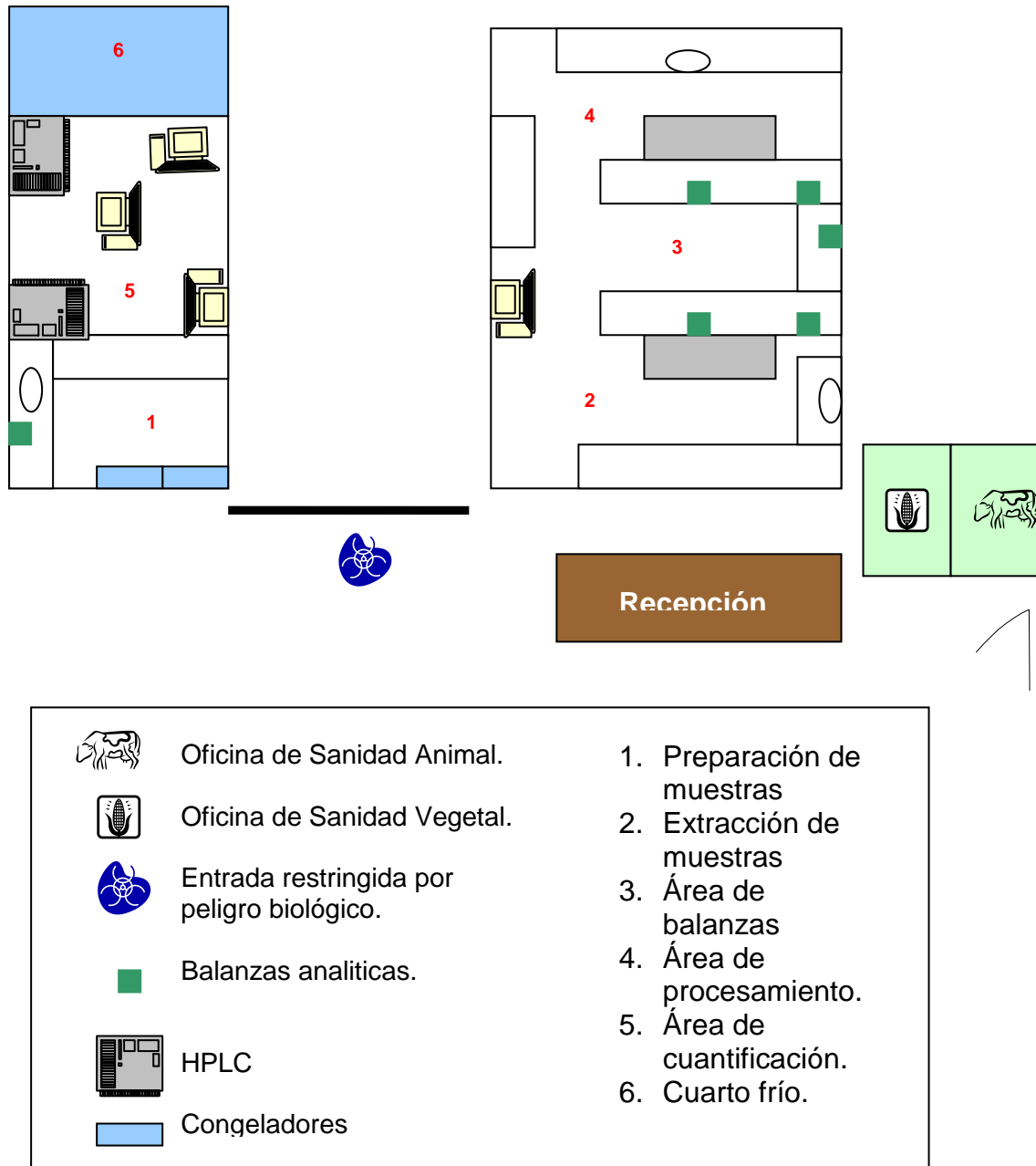


Figura No. 5: Croquis del Laboratorio de Residuos Tóxicos

- Normativo de bioseguridad de los laboratorios

El Laboratorio de Diagnóstico e Investigación Veterinarias del MIDA cuenta con un comité de bioseguridad, con el objeto de brindar seguridad a los técnicos y laboratoristas y saber que hacer en caso de un derrame biológico. (Normativo de bioseguridad, Ministerio de Desarrollo Agropecuario).

Al principio, en el medio y al final del laboratorio, existe una botella de solución salina, en caso de que a algún laboratorista le caiga alguna sustancia en los ojos.

En la mitad del laboratorio hay una regadera en caso de algún derrame en cualquier área del cuerpo. La primera unidad de laboratorio, es decir la Unidad de Biología Molecular, y la última, Bacteriología, cuentan con un Kit para derrame biológico el cual contiene:

- Gafas protectoras
- Mascarillas
- Delantal de plástico
- Bata desechable
- Guantes de plástico de uso doméstico
- Guantes de látex
- Protectores de calzado
- Hipoclorito de sodio (cloro de uso doméstico) al 5.25%
- Papel toalla
- Paños absorbentes
- Bolsas para autoclave (de dos tamaños)
- Envase plástico para punzo cortantes
- Pinzas para recoger vidrios rotos
- Recogedor con escobilla incorporada
- Señal de Advertencia: BIOPELIGRO DERRAME
- Instrucciones de uso del Kit
- Formulario CB- F001, para reporte de emergencias o accidentes.

Además, según los análisis realizados en cada laboratorio poseen cámaras de extracción de gases, entre otros objetos.

- Procedimiento para recoger derrames biológicos

Antes de proceder a recoger un derrame biológico, asegurarse de colocarse la indumentaria de protección personal contenida en el Kit (bata, guantes, mascarilla, delantal y cubre calzado).

Limitar al mínimo el número de personas expuestas durante la intervención de emergencia e impedir el acceso del resto del personal.

1. Colocar la señal de Advertencia de DERRAME BIOLÓGICO en un área cercana y visible.
2. Eliminar los restos de cristal, plástico, agar, etc., en el caso de rotura de material de vidrio, vierta en forma circular alrededor del derrame cloro al 5.25%.
3. Cubrir los recipientes rotos con una toalla absorbente o papel toalla empapado en cloro al 5.25% y dejar que actúe de 10 a 20 minutos, luego recoger con pinzas o con el recogedor y su escoba incorporada, los trozos rotos, la toalla absorbente y papel toalla, y colocarlo dentro del recipiente de plástico rígido o una bolsa autoclavable.
4. El material roto, los utensilios y la indumentaria desechable se esterilizarán en autoclave. El recogedor y la escobilla pueden dejarse sumergidas en cloro al 5.25% por 24 horas.
5. Luego de recoger los materiales contaminados, lavar el espacio donde se produjo el vertido con abundante agua y detergente. Por último, desinfectar con hipoclorito de sodio al 5.25%. (no debe usarse en superficies metálicas).
6. Si el derrame ocurre dentro de la cámara de seguridad biológica, colocar inmediatamente toallas de papel absorbente empapadas en alcohol al 70% o en solución de amonio cuaternario (400 ppm). Encender el sistema de extracción de la cámara, retirar las toallas de papel absorbente y colocarlas dentro de una bolsa de bioseguridad, para su descontaminación en autoclave. Cualquier salpicadura de los materiales

colocados dentro de la cabina deberán ser limpiados inmediatamente con una talla humedecida con solución descontaminante.

7. Reportar el accidente en el Formulario CB-F-001 (Anexo No.1), entregar el documento original al Jefe (a) del Laboratorio y una copia al Oficial de Bioseguridad.

También existen extintores distribuidos en el laboratorio en caso de incendios.

4.5 Fincas visitadas por Inspección epidemiológica

4.5.1 Centro de Producción larval Farallón, S.A.

- Ubicación geográfica

El centro de producción larval Farallón S.A., dedicado enteramente al desarrollo de larvas de camarón, *L. vannamei*, se encuentra ubicado en el corregimiento de Penonomé, distrito de Coclé, Panamá.

La finca consta de 25 piletas circulares en uso, de las cuales 10 son utilizadas temporalmente para el cultivo experimental de Cobia (*Rachycentron canadum*).

Además, el establecimiento cuenta con su propio laboratorio de microalgas para la alimentación de las larvas; la microalga que ellos utilizan es la *Thalassiosira sp.*

También existe un área de Raceways y 3 piscinas utilizadas como reservorio.



Figura No. 6: Foto aérea del centro de producción larval Farallón S.A.

4.5.2 Camaco, S.A.

- Ubicación geográfica

Ubicado en el corregimiento de Agua dulce, distrito de Coclé, Panamá. Aproximadamente a 45 minutos de la ciudad de Panamá.

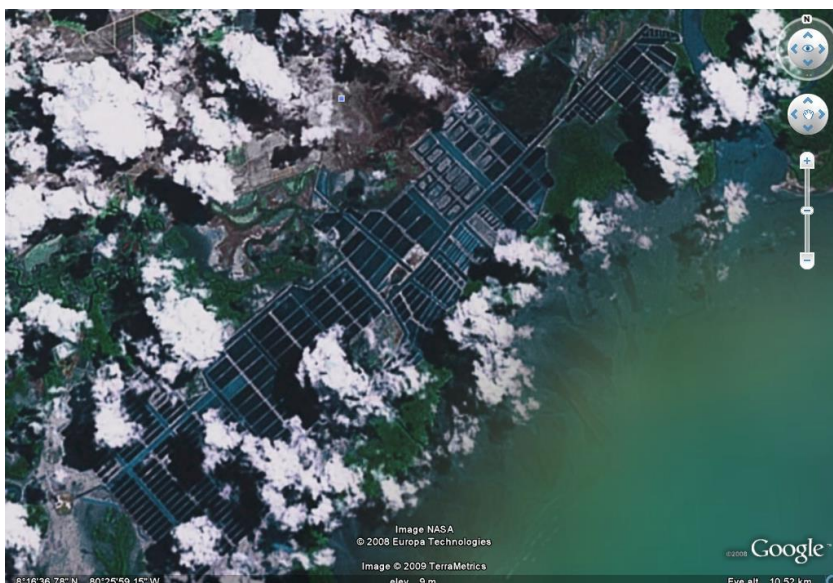


Figura No. 7: Vista aérea de la disposición de los estanques de la finca Camaco, S.A. extensión de 10 Km.

4.5.3 Truchas Bambito, S.A.

- Ubicación geográfica

Truchas Bambito se localiza en el corregimiento de Bambito, dentro del distrito de Chiriquí, Panamá.

5. Detección de agentes infecciosos causantes de enfermedades en *Litopenaeus vannamei* a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para llevar a cabo un PCR se necesita conocer la naturaleza de las enfermedades que se analizarán en estos procesos. Las principales enfermedades que afectan a los camarones de la especie *Litopenaeus vannamei* son:

- WSSV – Virus de la mancha blanca
- TSV – Síndrome del Taura
- YHV – Enfermedad de la Cabeza Amarilla
- IMHV - Mionecrosis
- NHP – Necrosis hematopancreática

5.1 Virus de la Mancha Blanca (WSSV)

5.1.1 Rango geográfico

El Virus causante del Síndrome de la Mancha Blanca se detectó por primera vez en Asia en el año de 1994 y llegó a América en el año de 1999. En el 2005 afectó grandemente los cultivos de *L. vannamei* en Brasil, decayendo así la producción de este en cuanto a la camaronicultura. (Morales y Cuéllar-Anjel, 2008)

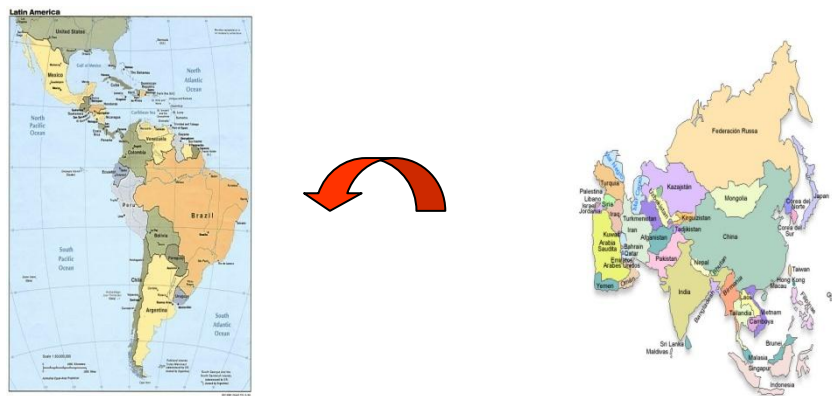


Figura 8: Distribución de la enfermedad

Fuente: MSc. Ivonne Cedeño

Afecta a todos los estadios del camarón y su forma de transmisión es horizontal, es decir a través del contacto con otros organismos con este virus o por la precedencia de este en el agua.

Se ha podido observar que en exportaciones de post-Larvas y de reproductores la forma de transmisión ha sido vertical. (MSc. Ivonne Cedeño, 2008)

5.1.2 Generalidades de la enfermedad

Anteriormente otros autores, cuando se refieren al Síndrome de la Mancha Blanca hacen mención a otros virus. Actualmente se saben que todos esos virus en realidad son el mismo agente. Entre estos están:

Cuadro No.1: Nombre de virus a quienes se les atribuía el Síndrome de la Mancha Blanca

• HHNBV	• RV-PJ	• SEMBV	• WSBV
Baculovirus de la necrosis hematopoyética e hipodérmica, conocida también como enfermedad explosiva de la epidermis del camarón o como la enfermedad del virus de China.	Virus intranuclear cilíndrico de <i>Penaeus japonicus</i> .	Baculovirus sistémico del ectodermo y del mesodermo, también llamada enfermedad roja, enfermedad de las manchas blancas.	Síndrome de la mancha blanca o enfermedad de la mancha blanca.

En la actualidad se sabe que no se trata realmente de un baculovirus, sino de un virus completamente distinto, con características propias con lo que se crea una nueva familia con el nombre de *Nimaviridae*.

WSSV (White Spot Syndrome Virus) es un virus de doble cadena de ADN; es de forma elíptica a cilíndrica, posee membrana trilaminar. El genoma de este virus es de aproximadamente 290 kbp., por lo cual lo convierte en uno de los virus más complejos que infecta el camarón.

5.1.3 Métodos de diagnóstico

- Métodos histológicos de rutina con tinción de hematoxilina/eosina (H&E).

- Método rápido de campo para la tinción de improntas.
- Hibridación *in situ* con sondas genéticas específicas.
- Aplicación de anticuerpos monoclonales (MABs) para la detección de WSSV en formato de ELISA de flujo lateral.
- PCR con pares de cebadores específicos para la detección de WSSV, con el método reconocido por la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal).

5.1.4 Especies Afectadas

Se han observado en especies como:

- *Peneaus mondon*
- *P. japonicus*
- *P. chinensis*
- *P. indicus*
- *P. mergiensis*
- *P. stylirostris*
- *P. vannamei*

5.1.5 Signos clínicos

Se ha reportado que durante la fase aguda de la enfermedad, los camarones reducen su consumo de alimento, se tornan letárgicos, se desprende fácilmente la cutícula y presenta unas pequeñas manchas blancas, de unos 0.5 a 2 mm. de diámetro, estas son conspicuas en la parte interna del caparazón.

En muchos casos, los camarones presentan una coloración rosada a rojiza, debido a la expansión de cromatóforos del epitelio cuticular. Casi no presenta manchas blancas.

Las poblaciones de camarón que presentan estas características tienden a exhibir altas tasas de mortalidad de hasta un 100% en un periodo de 3 a 10 días después de observados los primeros signos.

5.2 Síndrome de Taura (TSV)

5.2.1 Rango geográfico

En caso contrario el Síndrome de Taura se observó por vez primera en América en el año de 1992, en una granja camaronera cercana al río Taura, Guayaquil, Ecuador; esta se propagó hacia Asia en 1999. (Morales y Cuéllar-Anjel, 2008).

Esta enfermedad se encuentra distribuida en países de Centro y Sur América.

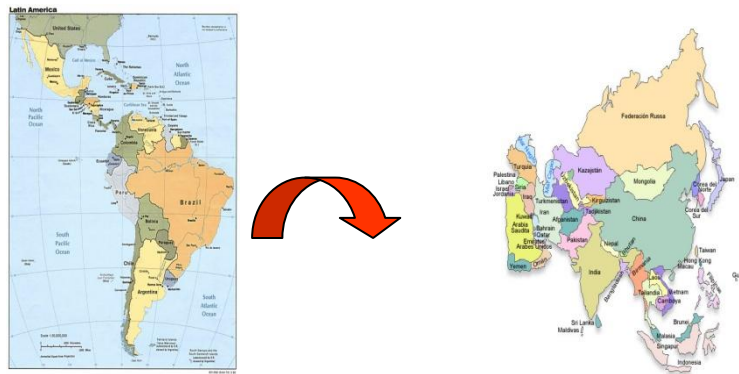


Figura 9: Distribución de la enfermedad

Fuente: MSc. Ivonne Cedeño

La enfermedad tiene tres fases:

- Aguda
- Transitoria
- Crónica

Afecta a estadios post larval (PL12), juveniles y adulto. Su modo de transmisión es horizontal, vertical, por presencia del virus en el agua, canibalismo, a través de insectos, aves, manipuleo de los organismos, etc.

El camarón infectado con Taura presenta una pigmentación color rojo pálido y el caparazón blando, presenta múltiples lesiones cuticulares melanizadas.

5.2.2 Agente etiológico

El virus del Taura ha sido clasificado tentativamente como un miembro de la Familia Picornoviridae. Presenta una morfología icosaédrica, las partículas tienen un diámetro de 30-32 nanómetros aproximadamente, el tipo de replicación es citoplasmático, contienen ARN de una sola cadena de una longitud aproximada de 9 kb. y la cápside está compuesta de tres proteínas estructurales principales y de dos secundarias.

5.2.3 Métodos de diagnóstico

- Histología de rutina con tinción de H&E
- Hibridación *in situ* con sondas genéticas específicas para TSV.
- Bioensayos en combinación con histología utilizando camarones juveniles *L. vannamei* como indicadores de la presencia de la enfermedad.
- Detección del virus por medio de RT-PCR.

5.2.4 Especies Afectadas

El rango de especies afectadas aun es desconocido. Sin embargo se han documentado la aparición de esta enfermedad en especies de *P. vannamei*, *P. stylirostris* y *P. setiferus*.

5.2.5 Signos clínicos

Los camarones afectados principalmente resultan ser juveniles de entre 0.05g a menos de 5g.

- Fase aguda

Los signos pueden ser detectados a simple vista. Un indicativo de esta enfermedad es la expansión de los cromatóforos rojos, ocasionando que el camarón se torne de una coloración generalizada rosa o rojiza, los urópodos se tornan de un color rojo. Los animales en esta fase tienden a morir durante la ecdisis o muda.

También se observa necrosis en el epitelio cuticular, especialmente en los urópodos y pleopodos, y una cutícula suave en todo su cuerpo.

- Fase crónica

Gran población de los camarones tiende a mostrar lesiones multifocales mecanizadas. Posiblemente se observe al camarón alimentándose y comportándose con normalidad, sin embargo pueden presentar cutícula suave y cromatoforos expandidos.

5.3 Enfermedad de la Cabeza Amarilla (YHV)

5.3.1 Rango geográfico

Esta enfermedad se detecto por primera vez en Tailandia, Asia en la década de 1990. Se cree que llego al continente americano en 1998, sin embargo el hallazgo no fue confirmado y pudo haber sido erróneo. (MSc. Ivonne Cedeño, 2008)

5.3.2 Agente etiológico

El agente etiológico de esta enfermedad es un nuevo virus conocido solamente por esta enfermedad y por ello el virus es llamado de la misma manera (YHV), este virus posee características propias y para clasificarlo se crea la familia de los *Roniviridae*.

Inicialmente se reportaba que este virus era un baculovirus citoplásmico de tipo B (virus de la granulosis) y la enfermedad fue llamada como Baculovirus de la cabeza amarilla (YHB). Fue descartada la opción de que fuera un baculovirus debido a que carecía de cdADN (Cadena de doble ADN).

El virus YHV es un virus de cadena de ADN sencilla, de forma cilíndrica y es de replicación citoplasmática.

5.3.3 Métodos de diagnóstico

- Historial y signos clínicos de YHV.
- Métodos histológicos de rutina con tinción H&E.
- Tinción de hemocitos con el método "Wright-Giemsa".
- A través de RT-PCR.
- Hibridación *in situ* con sondas genéticas específicas.

5.3.4 Signos clínicos

Uno de los principales signos clínicos en camarones afectados es el incremento en el consumo de alimento.

Posterior al exceso en el consumo de alimento, los camarones dejan de alimentarse completamente, se pueden observar camarones moribundos nadando con letargia en la superficie y orillas. Algunos exhiben una coloración amarillenta en el cefalotórax, de ahí el nombre de la enfermedad.

5.4 Virus de la Mionecrosis Infecciosa (IMNV)

5.4.1 Generalidades de la enfermedad

La enfermedad puede transmitirse de manera horizontal, a través del agua y por canibalismo. También se cree que la transmisión vertical es posible, sin embargo esta no ha sido demostrada. Afecta a todos los estadios del camarón.

5.4.2 Rango Geográfico

Esta enfermedad se descubrió por primera vez en la costa del Nordeste de Brasil y se propago hacia Asia.

5.4.3 Agente etiológico

El agente infeccioso es el virus del genero *Totiviridae*. Un virus con ARN de 40nm.

5.4.4 Signos clínicos de importancia

Esta enfermedad causa necrosis de los músculos estriados en el abdomen y el cefalotórax. El camarón se muestra opaco. Las zonas afectadas son multifocales en un principio, volviéndose más difusas con el tiempo y expandiéndose hasta abarcar la mayor parte de la cola.

Esta enfermedad presenta una fase inicial, cuando el virus se adapta, una fase aguda, en donde los camarones se tornan rojizos, y otra fase crónica.

La enfermedad puede pasar desapercibida, pero en otros casos causa una mortalidad menor del 10% de la población y puede aumentar a un 50% de mortandad.

5.5 Necrosis Hematopancreatítica (NHP)

5.5.1 Generalidades de la enfermedad

Enfermedad que fue reportada por primera vez por Johnson en 1989, reconocida como hepatopáncreas granulomatosos, causando altas mortalidades en granjas camaroneras en todo el continente americano con una tasa de entre el 20% y 95% de mortalidad en sistemas de cultivo de *Penaeus vannamei* y *Penaeus stylirostris*. (Morales y Cuéllar-Anjel, 2008).

El agente causal es una bacteria del genero Rickettsia, pequeño coco bacilo Gram. Negativo con un diámetro de 0.36nm. Esta bacteria se infecta y se multiplica en el citoplasma de las células epiteliales de los túbulos del hepatopáncreas.

El organismo no muestra sintomatología en la fase inicial del organismo.

En la fase aguda, el primer signo clínico es la reducción en el consumo del alimento en post-larvas tardías, juveniles y adultos hasta que dejan de comer por completo.

Luego aparecen camarones moribundos nadando cerca de la superficie y en las orillas de los estanques. Estos presentan palidez en todo su cuerpo, branquias color amarillo pálido a café y el hepatopáncreas atrofiado, con un color café claro u oscuro, provocando que sea fácil de confundir con enfermedades virales.

6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, PCR por sus siglas en ingles (Polimerase Chain Reaction), es un método enzimática de amplificación de secuencias específicas de ADN, esta permite la síntesis in vitro de un fragmento de ADN de forma que en cada ciclo del proceso, se duplica el numero de moléculas. Es de esta manera que es utilizada para la detección genómica de ciertos microorganismos patógenos como virus,

ya sean ADN o ARN, y bacterias en muestras de camarones. (Morales y Cuéllar-Anjel, 2008)

La PCR es utilizada en camarones para la detección de los principales virus que afectan al camarón, tales como:

- WSSV (Síndrome de la Mancha Blanca)
- IHHNV (Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética Infecciosa)
- BP (Baculovirus penaei)
- MBV (Mondón Baculovirus)
- SMV (Parvovirus penaei)
- YHV (Síndrome de la Cabeza Amarilla)
- IMNV (Síndrome de Mionecrosis Infección)
- TSV (Síndrome del Taura)
- PvNV (Nodavirus penaei)

6.1 Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son macromoléculas constituidas con largas cadenas de monómeros, es decir, polímeros formados por la repetición de monómeros, llamados nucleótidos unidos mediante enlaces. Se forman, así, largas cadenas o polinucleótidos. Los ácidos nucleicos funcionan de manera primaria como almacén y transmiten la información genética, pero también pueden tener funciones estructurales y catalíticas. (Karp, 2005).

El descubrimiento de los ácidos nucleicos se debe a Miescher que en la década de 1860 aisló de los núcleos de las células una sustancia ácida a la que llamó *nucleína*, la cual posteriormente se cambió el nombre a ácido nucleico. (Wikipedia).

Existen dos tipos de ácidos nucleicos que se encuentran en los organismos vivos. Estos son el ácido desoxirribonucleico (DNA) y el ácido ribonucleico (RNA). (Karp, 2005).

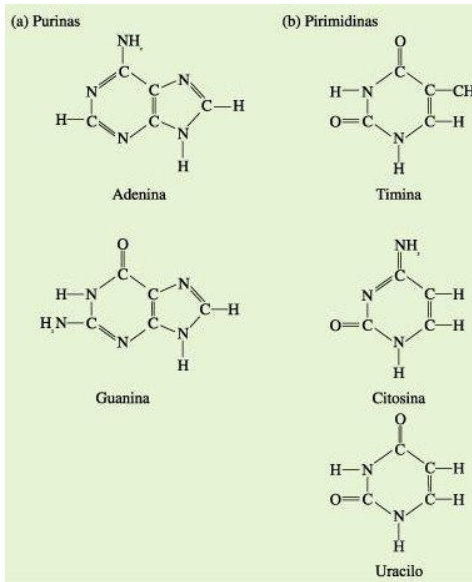


Figura No. 10: Estructura de los nucleótidos.

6.1.1 Ácido Desoxirribonucleico (ADN)

El ADN es un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y el funcionamiento de todos los organismos vivos conocidos y también de los virus, excepto algunos cuyo material genético es ARN (los retrovirus). La función principal de las moléculas de ADN es el de ser portador y transmisor entre generaciones de información genética.

La estructura del ADN es una doble hélice. Las bases del ADN se encuentran en pares, los cuales hacen los escalones de la escalera. Los laterales de la escalera son la médula estructural del ADN. Estos laterales no contienen información, sólo sostienen a las bases en su posición correcta.

Las bases del ADN normalmente se aparean Guanina con Citosina y Anina con Tinina. (University of Utah).

- Estructura del ADN

El ADN es una molécula bicatenaria, formada por dos cadenas y las bases nitrogenadas enfrentadas. En su estructura se distingue:

1. Estructura primaria:

Secuencia de nucleótidos encadenados. Es en estas cadenas donde se encuentra la información genética, y dado que el esqueleto es el mismo para todos, la diferencia de la información radica en la distinta secuencia de bases nitrogenadas. Esta secuencia presenta un código, que determina una información u otra, según el orden de las bases.

2. Estructura secundaria:

Es una estructura en doble hélice. Permite explicar el almacenamiento de la información genética y el mecanismo de duplicación del ADN.

Es una cadena doble, según el tipo de ADN. Ambas cadenas son complementarias, pues la adenina y la guanina de una cadena se unen, respectivamente, a la timina y la citosina de la otra. Ambas cadenas son antiparalelas, pues el extremo 3' de una se enfrenta al extremo 5' de la homóloga.

3. Estructura terciaria:

Almacenamiento del ADN en un espacio reducido, para formar los cromosomas.

6.1.2 Ácido Ribonucleico (ARN)

El RNA es una molécula prebiótica que existe desde aproximadamente 3.8 millones de años. Remontándose a 1940 los primeros estudios de esta ácido nucleico. El RNA es una macromolécula polinucleorídica de una sola cadena que sigue una dirección en sentido 5' a 3', se encuentra constituida por elementos químicos conocidos como bases nucleotídicas, que son del tipo de la adenina, citosina, guanina y uracilo y también de azúcar ribosa. (Hermosillo, 2003).

Se han identificado tres clases de RNA:

Cuadro No. 2: Clases de RNA

<ul style="list-style-type: none"> • El RNA mensajero (mRNA) 	<ul style="list-style-type: none"> • RNA transferencia (tRNA) 	<ul style="list-style-type: none"> • RNA ribosomal (rRNA)
<p>Molécula de RNA que es el resultado de la transcripción de una secuencia de DNA. Salvo ciertas excepciones aisladas, un RNA mensajero madura en el núcleo y es exportado al citoplasma para ser traducido.</p>	<p>Son moléculas monocatenarias que adoptan un plegamiento o estructura tridimensional característica, en forma de "L".</p>	<p>La función de la rRNA es proporcionar un mecanismo de decodificación de mRNA en <u>los aminoácidos</u> y de interactuar con el tRNA durante la <u>traducción</u> proporcionando <u>peptidil-transferasa</u>.</p>

- **Estructura del RNA**

Se observa que químicamente es muy similar al DNA, contiene cuatro tipos de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster en dirección 3'-5'.

Una de las diferencias que existen entre ADN y ARN es que el azúcar constitutivo del DNA es la desoxirribosa, mientras que en el RNA contiene ribosa, la cual a su vez contiene un grupo hidroxilo (OH) adicional; la segunda diferencia es que el RNA no contiene la base nucleotídica timidina y en su lugar posee la base nucleotídica uracilo.

6.1.3 Extracción de Ácidos Nucleicos

- Extracción de ADN para detección de virus de la Mancha Blanca con el método de Lysis Buffer

➤ Materiales

- Muestra (pleopodos, nauplios, post-larvas, o cualquier otro tejido del camarón)
- Tubos Spondorf de 1.5 ml.
- Gradillas
- Palillos de madera
- Maceradores
- Lysis Buffer
- Agua destilada
- Micro pipetas
- Centrifuga
- Vortex
- Incubadora de baño de María
- Maceradores
- Alcohol al 95%
- DEP

Metodología

- Primero se realiza la limpieza del área de trabajo, con hipoclorito de sodio al 2% y con alcohol al 70%.
- Se coloca papel aluminio y encima de este se le coloca papel absorbente para evitar derrames y contaminación. Sobre esto es que se realiza todo el proceso.
- Se coloca la gradilla con los microtubos que serán utilizados, todos con su debida identificación.
- Llenar cada microtubos más o menos a 1/3 de la capacidad del tubo de 1.5 ml. o llenar 500 microlitos. Para el caso de pleopodos colocar 2 pleopodos del organismo en cada tubo.

- En el caso de que sean juveniles o post-larvas, hacer un conteo de más o menos 30 organismos para cada microtubo. En el caso de branquias o nauplios llenar 500 microlitos en el tubo.
- Retirar la muestra con ayuda de palillos o pinzas para que estén lo mas secas posibles y libres de alcohol o formol.
- Adicionar a la muestra 500 microlitos de solución amortiguadora de digestión, Lysis Buffer, presente en el Kit. IQ 2000.
- Macerar la muestra con ayuda de los maceradores.
- Incubar las muestras por 10 minutos en el baño de María a 95°C. para este proceso hay que asegurar la tapa ya que esta puede desprenderse del tubo debido a que casi esta a punto de ebullición.
- Luego centrifugar las muestras por 10 minutos a una velocidad de 11,239 rpm o 14,000 rpm
- Colocar 200 microlitos del sobrenadante en un microtubo nuevo de 1.5 ml. debidamente identificado con 400 ml de alcohol al 95%.
- Tapar los tubitos y pasarlos por el vortex.
- Centrifugar por 5 minutos a 11,239 rpm.
- Decantar el alcohol.
- Secar el pellet a temperatura ambiente durante unos 35 minutos hasta que ya no tenga nada de humedad.

- Resuspender con agua DEPC. La resuspensión se hace con 200 microlitros en el caso de nauplios, pleopodos y post-larvas y 100 microlitros en el caso de branquias.
- El ADN resuspendido se incubaba a 65°C durante 10 minutos en el baño de María y se hace una dilución 1:10.
- En el PCR para ADN, detección del virus de la Mancha Blanca, se trabaja la muestra resuspendida, es decir la concentración pura, y adicionalmente su dilución.
- La dilución se hace con 45 microlitros de H₂O DEPC y 5 microlitros del ADN resuspendido. Garantizando así que el exceso de ADN pueda ser captado en la dilución 1:10.
- Extracción de ADN para la Detección del virus de la macha Blanca con el método DTAB - CTBA.

Este procedimiento se realiza cuando las muestras son “sucias”, es decir cuando llevan mucho tiempo siendo conservadas en alcohol o en formol. Esto es debido a que las muestras sucias contienen más proteínas e inhibidores de la PCR, por lo consiguiente se utilizan detergentes catiónicos fuertes para obtener una mayor tasa de recuperación de ADN y más limpio

- Materiales

- | | |
|-----------------------|-----------------------|
| ○ Muestras | ○ Incubadora, baño de |
| ○ Vortex | María. |
| ○ microtubo | ○ Spin. |
| ○ Micropipetas | ○ Cloroformo |
| ○ Centrifuga | ○ Gradilla |
| ○ Solución DTAB -CTAB | ○ Papel aluminio |



Figura No. 11: Solución DTAB y CTAB para la extracción de Ácidos Nucleicos.

Metodología

- Limpiar el área de trabajo con hipoclorito de sodio al 2% y con alcohol al 70%.
- Colocar papel aluminio y papel absorbente.
- Colocar 1/3 de la muestra del organismo en un microtubos de 1.5 ml. o colocar 2 pleopodos o 30 post-larvas.
- Colocar 600 microlitros de solución DTAB – CTAB.
- Vortexear las muestras.
- Incubar a 75°C durante un periodo de 5 minutos en el baño de María.

- Esperar a que enfríe la muestra
- Pasarlo por el vortex y el spin rapidamente
- Adicionar 700 microlitros de cloroformo y vortexear de nuevo por más o menos 20 segundos cada muestra.
- Pasar a la centrifuga por 5 minutos a 11,239 rpm.
- Transferir 2 microlitros de la fase acuosa a un tubo nuevo de 1.5 ml. con 100 microlitros de CTAB solución y 900 microlitros de ddH₂O.
- Vortexear e incubar a 75°C durante 5 minutos.
- Dejar enfriarla a temperatura ambiente.
- Centrifugar por 5 minutos.
- Transferir la solución a otro microtubo con 300 microlitros de etanol al 95%.
- Vortexear y centrifugar por otros 5 minutos a 11,239 rpm.
- Lavar el pellet con 200 microlitros de etanol al 70%.
- Pasarlo por el spin.
- Resuspender con solución TE Buffer.

- Extracción de ARN para la detección de virus causantes de las enfermedades de Cabeza Amarilla, Síndrome del Taura y Mionecrosis.
 - Extracción de ARN con el método RT – PCR

➤ Materiales

- Hipoclorito de sodio al 2%
- Alcohol al 70%.
- Papel aluminio
- Papel absorbente
- Cámara de extracción de gases
- Muestras
- Microtubos de 1.5 ml
- Micropipetas.
- Palillos de madera
- Pinzas.
- Maceradores
- Cloroformo
- Vortex
- Isopropanol
- Etanol al 75%

Metodología

- Limpiar las áreas de trabajo. Por el tipo de reactivos que se utilizan en esta extracción deben de ser trabajados en la cámara de extracción de gases.
- Limpiar las áreas con hipoclorito de Sodio al 2% y con alcohol al 70%.
- Colocar papel aluminio y papel absorbente en las áreas.
- Tomar la muestra para llenar 1/3 del microtubos o colocar 2, pleopodos, 30 post – larvas.
- En el cazo de juveniles mayores a PL 20 retirar la cabeza, ya que esta posee muchas enzimas inhibidoras de PCR.

- Retirar las muestras con la ayuda de pinzas o palillos de madera.
- Colocar en los microtubos 500 microlitros de solución de extracción de RNA.
- Macerar las muestras.
- Dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos
- Adicionar 100 microlitros de cloroformo
- Pasar las muestras por el vortex por 20 segundos
- Dejar a temperatura ambiente por 3 minutos.
- Centrifugar por 15 minutos a una velocidad de 12,000 rpm.
- Transferir 200 microlitros de la fase acuosa a un microtubos nuevo con 200 microlitros de isopropanol.
- Pasarlo por el vortex rápidamente.
- Centrifugar durante 10 minutos a 12,000 rpm.
- Decantar el isopropanol
- Lavar el pellet o la parte sólida con 500 microlitros de etanol al 75%.
- Centrifugar durante 5 minutos a 9,000 rpm o 2 minutos a 14,000 rpm.
- Decantar el etanol

- Dejar secarlo durante 35 minutos aproximadamente y resuspender con DEPC ddH₂O.
 - Para nauplios – 250 microlitros.
 - Para PL y pleopodos – 350 microlitros.
 - Para branquias y músculo – 200 microlitros.

- Se incuba finalmente durante 10 minutos a 65°C en el baño de María.

6.2 Oligonucleótidos

Son una secuencia corta de ADN o ARN, con cincuenta o menos pares de bases. Tienen distintas funciones: como cebadores en reacciones de amplificación, como sondas de hibridación y en bloqueos específicos de ARN mensajero.

La hibridación del ADN permite identificar genes; consiste en desnaturalizar una proteína y agregar un oligonucleótido y si éste se adhiere a las cadenas (híbridas) indica que existe ese gen dentro del genoma.

La relación entre temperatura de hibridación y temperatura de fusión es muy importante en la PCR. Como regla general la temperatura de hibridación debe ser 5- 8°C más baja que la de fusión. Por tanto, si queremos un oligonucleótido con una temperatura de hibridación de al menos 50°C, correspondería a un oligonucleótido con una temperatura de fusión de (T_m ~ 55-58°C).

6.2.1 T_m de los oligonucleótidos

El tamaño del oligonucleótido influye en la especificidad, en la temperatura de fusión y en el tiempo necesario para la hibridación del oligonucleótido a su secuencia complementaria, por tanto es decisivo para que salga bien la PCR. Los oligonucleótidos de 18 a 24 bases son muy específicos de secuencia, siempre que la temperatura de hibridación sea óptima.

6.2.2 Temperatura de fusión (T_m)

Es importante tener en cuenta que en una reacción de PCR hay dos oligonucleótidos. Ambos oligonucleótidos deberían diseñarse de manera que tengan temperaturas de fusión similares. Si los oligonucleótidos no tienen T_m parecidas, la amplificación será menos eficiente o incluso puede no funcionar ya que el oligonucleótido con la T_m más alta hibridará mal o inespecíficamente a bajas temperaturas mientras que el oligonucleótido con la T_m más baja puede que no funcione a temperaturas más altas.

6.3 Historia de la PCR

La PCR fue un proceso que no recibió mucha atención. Comenzó en el año de 1976, con el descubrimiento de la Taq polimerasa extraída de la bacteria termófila *Thermos aquaticus*, la cual permitió automatizar el proceso. Esta bacteria es estable a altas temperaturas y permanece activa hasta después de la desnaturalización. (Bioinformatics)

Mas tarde el Dr. Kary Mullis, quien recibió el premio Nobel de Química en el año de 1993 por la invención de la PCR, diseño el mecanismo de la misma en 1987.

Utilizo la PCR para amplificación del gen de β -hemoglobina humana, y el diagnostico prenatal de anemia falciforme. (MSc. Ivonne Cedeño, 2008).



Figura No. 12: Primer modelo de equipo para la PCR.

Comenzando con una única molécula del material genético ADN, la PCR puede generar 100 billones de moléculas iguales en un lapso corto de tiempo. (Revista Scientific American).

La PCR se realiza en un Termociclador. Esta es una máquina que calienta y enfría la reacción en periodos cortos de tiempo.



Figura No. 13: Termociclador utilizado para la PCR

6.4 Principio de la PCR

El principio de la PCR consiste en determinar la secuencia de interés y seleccionar pequeños segmentos de nucleótidos llamados “primers”, iniciadores o cebadores, los cuales son complementarios con la secuencia de nucleótidos de los extremos opuestos de las cadenas del material genético, a partir de estos se inicia la elongación o síntesis de nuevas cadenas en el extremo 3' de cada primer. (Vielka y Cuéllar-Anjel, 2008).

La PCR se realiza en forma de ciclos. Cada uno de los ciclos duplica la cantidad de ADN, lo cual permite obtener hasta un millón de copias de un solo fragmento en un lapso corto de tiempo.

Son importante ciertos parámetros para la aplicación de esta técnica, tales como suministrar en abundancia iniciadores o primers, además de desoxinucleotidos

triofosfatados (dNTPs). Es de suma importancia una fuente renovada de ADN polimerasa, la cual es la enzima encargada de la síntesis de las cadenas complementarias, y los ciclos periódicos de cambios de temperatura. Estos consisten en:

- Desnaturalización del ADN a 100°C.
- Alineamiento de los primers con las secuencias en temperaturas de entre 50° y 60°C.
- Síntesis del ADN a 72°C más o menos.

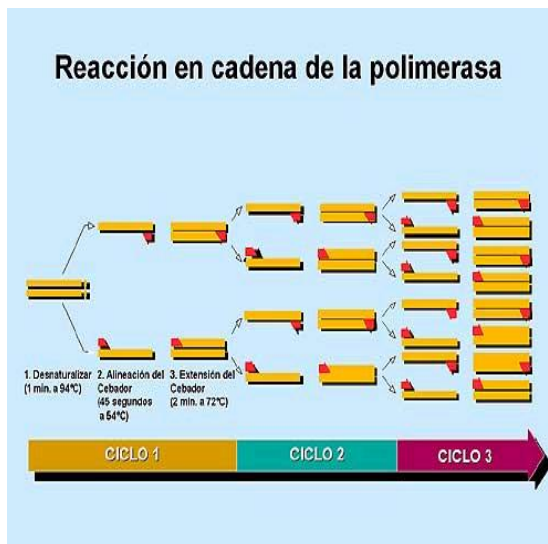


Figura No. 14: Descripción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

6.5 Descripción

La reacción en cadena de la polimerasa imita el fenómeno de replicación natural del ADN que ocurre en células vivas. Durante la replicación, las 2 cadenas que componen al ADN se separan y una enzima especializada, la polimerasa, hace una copia de cada una de estas cadenas.

La polimerasa para poder realizar una copia necesita de otros tres ingredientes. Uno de ellos es una reserva de los cuatro bloques básicos que constituyen a la molécula de ADN (Guanina, Timina, Citosina, Adenina), que son los nucleótidos o bases. Otro

ingrediente es una fibra corta de ADN copiado, cebador u oligonucleótido. El tercero es el cofactor $MgCl_2$, sin este la enzima polimerasa no funciona.

La reacción funciona en tres bases. La primera consiste en la desnaturalización, en la cual el fragmento original de ADN se calienta hasta una temperatura de entre 90° a $95^\circ C$ durante un tiempo aproximado de 30 segundos, provocando así la separación de las 2 cadenas. La segunda fase es la de anillaje, en la cual la temperatura de la mezcla se baja hasta unos $55^\circ C$ durante 20 segundos para que los primers se enlacen con el ADN. En la última fase, polimerización, la temperatura se eleva hasta unos $75^\circ C$ para que la polimerasa copie la molécula de ADN.

Estas tres fases se trabajan juntas todas en un mismo microtubo. Este proceso puede durar unos 2 minutos, pero el ciclo se puede repetir sin límite, solo que los ingredientes para la reacción deben de ser renovados cada 30 ciclos. Los 30 ciclos duran menos de 3 horas.

Si el genoma que se desea encontrar es un ARN, se debe de realizar el mismo proceso, con la diferencia que a este se le adiciona un paso más. En la muestra de ARN extraído, la enzima transcriptasa reversa, transcribe el ARN en ADN complementario (cADN) y de este modo ya puede ser amplificada mediante una reacción normal de PCR.

La enzima utilizada actualmente es termoestable, no se inactiva por las elevadas temperaturas de la primera reacción, esta enzima es la Taq Polimerasa, proviene de *Thermus aquaticus*, la cual es una bacteria termófila.

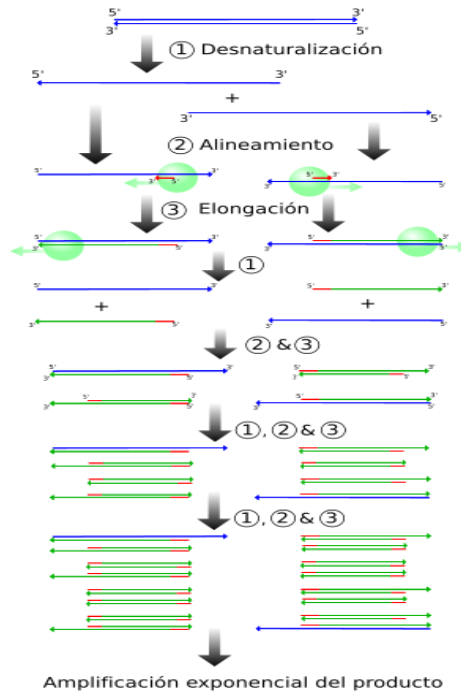


Figura No. 15: Descripción de las fases de la PCR.

6.6 Aplicaciones de la PCR

La PCR se empezó a aplicar más tarde en áreas como:

- Investigaciones
- Medicina, como herramienta de diagnóstico
- Genotipificación
- Ciencias forenses
- Paleontología
- Antropología biológica
- Agronomía

6.7 Tipos de PCR

- PCR anidada

En ocasiones una ronda de PCR no da un producto único a partir de un templado complejo. Se puede resolver utilizando un segundo par de primers que hibriden un poco más internamente que los primeros, entonces se realiza una segunda ronda de PCR usando el producto de la primera.

- PCR múltiplex

Esta describe una PCR en la cual hay presentes múltiples pares de primers (hasta 8) lo que da como resultado una serie de productos. Los mismos pueden verse como múltiples bandas en un gel de agarosa. Este tipo de PCR es frecuentemente usada en diagnóstico médico.

- RT-PCR

Donde el molde inicial es ARN y se requiere de una transcriptasa inversa, para realizar la conversión del ARN a un tipo de ADN llamado ADNc (ADN complementario).

La transcriptasa inversa o retrotranscriptasa es una enzima de tipo ADNpolimerasa presente en los retrovirus, que tiene como función sintetizar ADN utilizando como plantilla el ARN viral, es decir catalizar la retrotranscripción o transcripción inversa. Su nombre obedece a que el proceso normal de la transcripción, la que se puede llamar directa, parte del ADN para determinar la secuencia del ARN durante su síntesis, y no al revés.

- PCR en tiempo real

Los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo tubo cerrado, sin necesidad de ninguna reacción posterior.

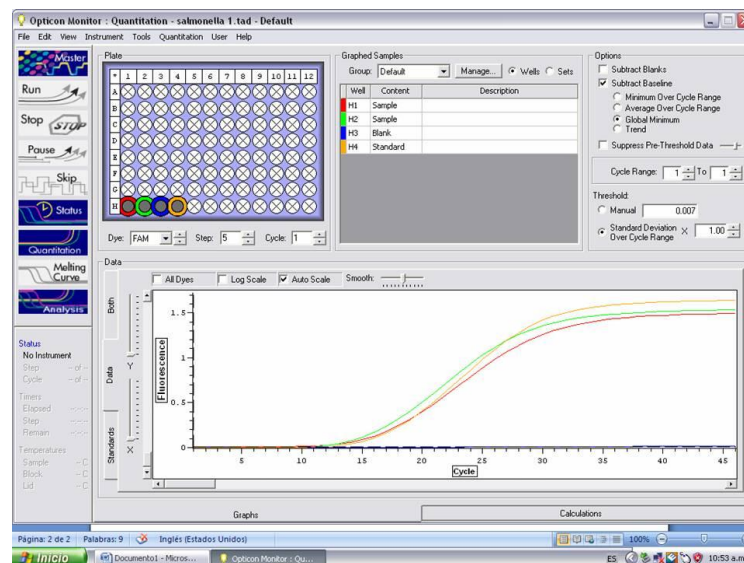


Figura No. 16: Ejemplo de PCR en tiempo Real

6.8 Variaciones de la PCR básica

- PCR específica de alelo: Para identificar polimorfismos.
- PCR assembly: La PCR se realiza en un fondo de oligonucleótidos largos con secuencias solapantes cortas.
- PCR touchdown: reducir el fondo no específico bajando gradualmente la temperatura de hibridación: a lo largo del proceso de PCR.
- PCR hot start: reduce la amplificación inespecífica.
- PCR – Tail: aislar secuencia desconocida que flanquea una secuencia conocida.

6.9 Reactivos de la PCR

Cuadro No. 3: Reactivos esenciales para la PCR

Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs)	Sustrato para polimerizar nuevo ADN.
Dos cebadores (primers)	Oligonucleótidos cada uno complementario a una de las dos hebras de ADN (18-25 pb) enfrentados y no más de 4Kb.
Iones divalentes	Mg ₂ ⁺ agregado como MgCl ₂ cofactores de la polimerasa. Estimula a la Taq para que incorpore dNTPs.
Solución amortiguadora	Mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa. Proporciona la fuerza iónica necesaria.
ADN polimerasa	La Taq polimerasa.
ADN molde	Contiene la región de ADN a amplificar.
Controles	Negativos y positivos, o internos.
Agua	Libre de Dnasa y Rnasas, 0.1% Dietil-pirocarbonato (DEPC), Agua milli-Q, grado molecular, Desionizada a 18m-ohms, purificada por UV y ozono.

Los reactivos esenciales para la PCR son el Ión Magnesio, los dNTPs, y el ADN polimerasa.

6.10 dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)

Son nucleótidos modificados que han perdido el grupo hidroxilo de la posición 3' de la desoxirribosa. La ADN Polimerasa puede incorporar estos ddNTPs a la cadena de ADN naciente. Pero no es posible que se una a estos ddNTPs ningún otro nucleótido por el extremo 3'. Una vez incorporado un nucleótido, se termina la síntesis de la cadena de ADN.

Pueden ser utilizados eficientemente en las reacciones de PCR en forma de:

- dig-dUTP, biotin-dNTPs, ddNTPs
- Fluorescent-dNTPs

Proveen de nucleótidos (base+azúcar+fósforo) a la reacción PCR.

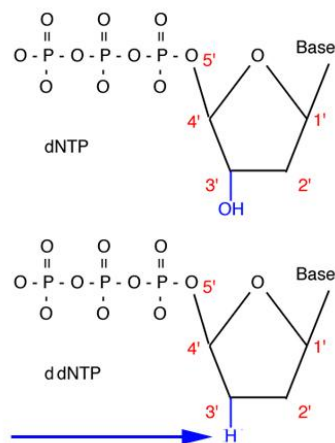


Figura No. 17: dNTPs

6.11 ADN polimerasa

Son enzimas termoestables capaces de sintetizar DNA "in Vitro".

No existe una ADN polimerasa capaz de iniciar la síntesis a partir de nucleótidos simples libres, todas requieren un oligonucleotido o iniciador (primer)

DNA polimerasa usados en la PCR

- DNA polimerasa I de *E. coli*,
- el fragmento de Klenow, transcriptasa inversa (utiliza como molde RNA para convertirlo en DNA),
- DNA polimerasa del bacteriófago T7,
- DNA Taq polimerasa. De *Thermus aquaticus*
- DNA polimerasa *Pyrococcus furiosus* (Pfu),
- DNA polimerasa *Thermococcus litoralis* (Vent)
- DNA polimerasa *Thermus termophilus* (Tth)

Todas ellas requieren Mg^{2+} .

6.12 Electroforesis

La detección del producto de la PCR se realiza normalmente mediante corrido electroforético. Dependiendo del tamaño de la amplificación y la resolución que deseemos se utilizan diferentes medios (agarosa, poliacrilamida) a distintas concentraciones. (Robertis, 1996).



Figura No. 18: Preparación de las muestras en cámara electroforética.

La electroforesis es un método de laboratorio en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa.

Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta son colocadas en un campo eléctrico, estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta, dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el polo negativo y aquellas cargadas positivamente se desplazarán hacia el polo positivo.

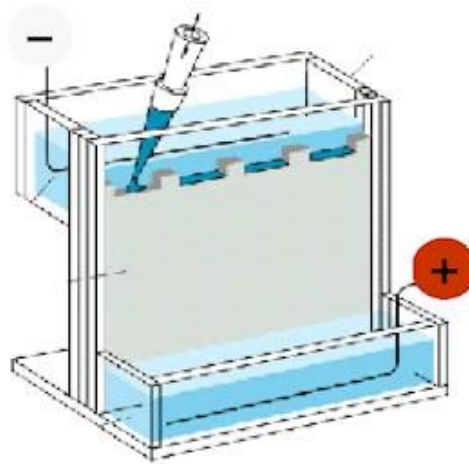


Figura No.19: Colocación de las muestras en el gel agarosa

6.13 Análisis de muestras

La visualización de las muestras se puede realizar con bromuro de etidio y con la ayuda de una lámpara de luz UV, también se puede visualizar con tinción de plata, fluorescencia o radioactividad.



Figura No. 20: Cámara de luz UV, utilizada para visualizar el resultado de la electroforesis.

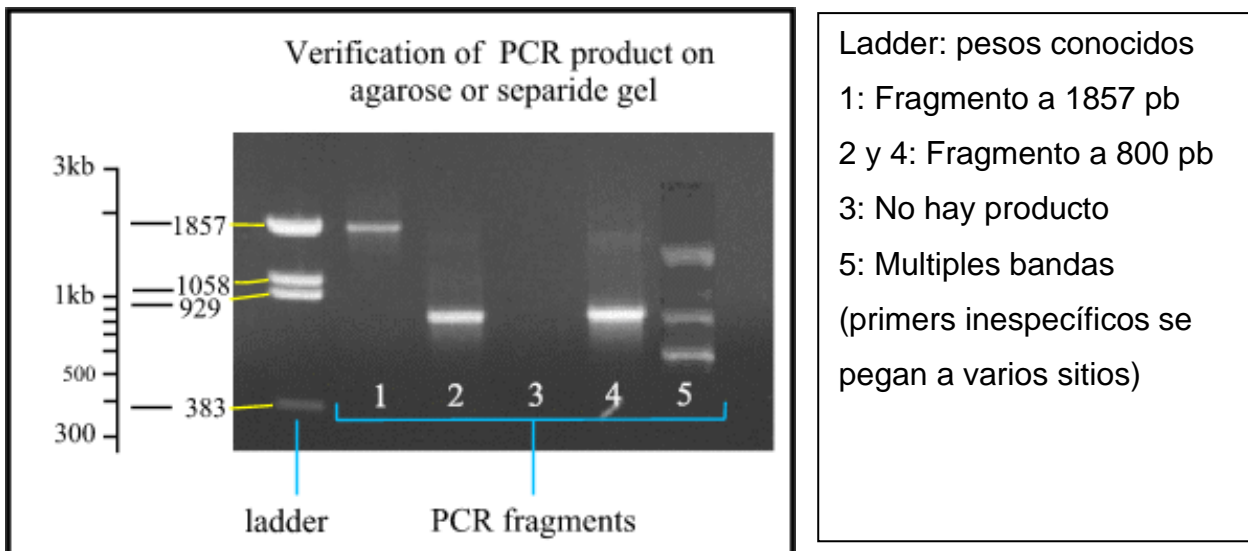


Figura No. 21: Resultado de una corrida electroforética

7. Norma ISO/IEC 17025 para la acreditación de ensayos

La Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE, esta exigiendo que como Ministerio, se acrediten ciertas pruebas de los análisis realizados en el laboratorio de Diagnostico e Investigación Veterinarias.

La Norma ISO/IEC 17025 contiene todos los requisitos que tienen que cumplir los laboratorios de ensayo y de calibración si desean demostrar que:

Tienen un sistema de gestión, son técnicamente competentes y son capaces de generar resultados técnicamente válidos.

La Unidad de Biología Molecular tiene en proceso de acreditación el ensayo de diagnóstico de Virus de la Mancha Blanca, (WSSV).

7.1 Descripción de la norma

La documentación para el proceso de acreditación debe de tener la siguiente información:

- Alcance
- Referencias Normativas
- Términos y definiciones
- Requisitos de Gestión
 - Organización
 - Sistema de calidad
 - Control de documentos
 - Revisión de solicitudes; ofertas y contratos.
 - Subcontrataciones
 - Compra de servicios y suministros
 - Servicios al cliente
 - Reclamos
 - Control de trabajos no conformes
 - Acción correctiva
 - Acción preventiva
 - Control de registros
 - Auditorias internas
 - Revisiones por la dirección

- Requisitos Técnicos
 - General
 - Personal
 - Instalaciones y condiciones ambientales
 - Métodos de calibración, ensayo y validación
 - Equipos
 - Trazabilidad de la medición
 - Muestreo
 - Manejo de objetos de ensayo y calibración
 - Aseguramiento de la calidad de los resultados
 - Informe de resultados

7.2 Adecuación a la norma el diagnóstico del virus de la Mancha Blanca Adecuación de la infraestructura a utilizar para el ensayo

- Separación de áreas de trabajo
- Sistema de Bioseguridad
- mantenimiento de equipos (programa)
- Validación de software
- Elaboración de Procedimientos (ISO/IEC 17025)

7.3 Procedimientos

Al basarse en la Normas ISO/IEC 17025 es fundamentarse en procedimientos que van a generar a su vez registros que permitan la trazabilidad.

7.4 Contenido de los procedimientos

- Alcance y Aplicación
- Referencias del Sistema de Gestión de Calidad y bibliográficas
- Resumen
- Salud y Seguridad
- Localización

- Definiciones
- Símbolos y abreviaturas
- Interferencias
- Manejo y disposición de desechos
- Equipos
- Reactivos, soluciones y materiales
- Control de calidad
- Procedimiento
- Resultados
- Flujo grama
- Anexos

7.5 Procedimiento de validación para un ensayo cualitativo

7.5.1 Validación

Es el proceso para evaluar las características de funcionamiento de un procedimiento de un ensayo y verificar que se cumplen los criterios exigidos a los datos

7.5.2 Parámetros a validar

- Repetibilidad (r) Cualitativamente

Es el grado de concordancia entre resultados sucesivos obtenidos con el mismo método sobre una materia idéntica sometida al ensayo, en las mismas condiciones (siempre el mismo operador, igual aparato, igual laboratorio y en pequeños intervalos de tiempo).

- Reproducibilidad (R) Cualitativamente

Es el grado de concordancia entre dos resultados individuales obtenidos con el mismo método sobre una materia idéntica sometida al ensayo, pero en condiciones diferentes (operadores distintos, aparatos diferentes, distintos laboratorios y/o épocas diferentes).

- Exactitud (E)

Es el grado de correlación con el valor real.

- Robustez

Es la habilidad de proporcionar resultados de exactitud y precisión bajo variedad de condiciones.

- Pureza de los reactivos

Los reactivos deben poseer la pureza necesaria que producen resultados lógicos y esperados. La pureza de los reactivos nos ayuda a determinar la especificidad de los primers. Por lo tanto el principio se basa en la verificación de los reactivos nuevos que ingresan en el laboratorio.

8. Conclusiones

- Se realizó la Práctica Profesional Supervisada exitosamente, siendo esta una gran oportunidad para el desarrollo y desempeño profesional.
- Se introdujo al ejercicio, específicamente de la carrera, a través de la realización de una práctica en donde se dio la oportunidad de participar en actividades reales propias de la acuicultura, así como en unidades productivas acuícolas y científicas en el campo del diagnóstico.
- Se aplicaron todas las enseñanzas, aprendizajes y experiencias adquiridas a lo largo de todo un periodo de formación en la carrera de Técnico en Acuicultura durante la realización de la pasantía.
- Se desarrollaron los valores morales y éticos en el desempeño profesional, durante la pasantía, lo cual contribuyó a que estos se consolidaran aun más.
- Para un buen desarrollo pecuario, la sanidad de los organismos en producción es de vital importancia para el éxito de la producción. La vigilancia epidemiológica, además de centrarse en la prevención, control y erradicación de enfermedades, también se enfoca en la bio-contención y bio-exclusión de una enfermedad.
- La implementación de la PCR a la vigilancia epidemiológica fue una gran innovación tecnológica y fue un gran apoyo para la detección de agentes infecciosos en organismos acuáticos.

9. Recomendaciones

- Seguir implementando actividades y prácticas, para que el estudiante aplique los conocimientos adquiridos durante el transcurso de su carrera.
- Realizar prácticas con un mayor periodo de tiempo, para que el estudiante, adquiera mayores conocimientos y experiencias en las actividades propias de la carrera para el desarrollo profesional.
- Continuar fomentando principios, valores morales y éticos en los estudiantes como parte de su formación.
- Contribuir en la participación de los estudiantes a cursos, talleres y prácticas sobre estrategias de producción e innovaciones tecnológicas, que le permitan incrementar los conocimientos ya adquiridos.

10. Bibliografía

1. Ausubel, F. 2002. Short protocols in molecular biology. 4^a ed. Estados Unidos, McGraw-Hill. 708 p.
2. Pontificia Universidad Javeriana, CO. 2003. Biología celular: electroforesis (en línea). Colombia, PUJ. Consultado 8 dic. 2008. Disponible en http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/el_electroforesis.html.
3. Fisicanet, AR. 2008. Biología: nucleótidos y ácidos nucleicos (en línea). Argentina, Fisicanet. Consultado 12 nov. 2008. Disponible en http://www.fisicanet.com.ar/biologia/introduccion_biologia/ap1/nucleotidos_y_acidos_nucleicos03.jpg
4. University of Utah, US. 2008. Construye una molécula de ADN (en línea). Estados Unidos, University of Utah. Consultado 28 oct. 2008. Disponible en <http://learn.genetics.utah.edu/es/units/basics/builddna/>
5. Cuéllar-Anjel, J. 1996. Identificación de las principales enfermedades y determinación de su prevalencia, en camarones penaeidos cultivados en Colombia. Tesis M.Sc. Santa Fé de Bogotá, CO, Pontificia Universidad Javeriana. 178 p.
6. Diagnóstico Médico, ES. 2007. RNA mensajero (en línea). España, Diagnóstico Médico. Consultado 14 dic. 2008. Disponible en [http://www.diagnosticomedico.es/descripcion/Rna_Mensajero_\(mrna\)-20593.html](http://www.diagnosticomedico.es/descripcion/Rna_Mensajero_(mrna)-20593.html)
7. Farming IntelliGene Technology Corporation, TW. YHV/GAV: instruction manual. Taiwan, Farming IntelliGene Technology. 15 p.

8. Fenner, F; McAuslan, BR; Mims, CA; Sambrook, J; White, DO. 1968. The biology of animal viruses. 2a ed. Estados Unidos, Academic Press. 834 p.
9. Jackson, DP; Lewis FA; Boylston, AW; Quirke, P. 1990. Tissue extraction of DNA an RNA and analysis by the polymerase chain reaction. Estados Unidos, University of Leeds. p. 499 – 504.
10. Jimenez, LF; Merchant, H. 2003. Biología celular y molecular. México, Prentice Hall. 853 p.
11. Jimenez Arce, G; Villalobos Quesada, MJ; Jimenez Montero, E; Palma Platero, W. 2007. Determinación de la efectividad de cinco protocolos de extracción de ADN a partir de material parafinado para estudios moleculares. Revista médica de la Universidad de Costa Rica 1 (1): 10-19.
12. Karp, G. 2005. Biología celular y molecular. 4a. Ed. Colombia, McGraw-Hill. 899 p.
13. Kong, W; Wang, Y; Wang, Q; Han, Y; Hu, Y. 2006. Comparision of three methods for isolation of nucleic acids from membranate inner ear tissue of rats. China, Union Hospital of Tongji Medical College. s.p.
14. Madigan, MT; Martinko, JM; Parker, J. 2004. Biología de los microorganismos. 10ª ed. España, Pearson Prentice Hall. 500 p.
15. MIDA (Ministerio de Desarrollo Agropecuario, PA). 2005. Sanidad animal (en línea). Paraguay, MIDA. Consultado 25 oct. 2008. Disponible en <http://www.mida.gob.pa/>
16. Morales, V; Cuellar, A. 2008. Guía técnica: patología e inmunología de camarones penaeidos. Panamá, s.n.t. 253 p.

17. OIE (Organización Mundial de Salud Animal, FR). 2009. Código de animales acuáticos (en línea). Francia, OIE. Consultado 28 nov. 2008. Disponible en http://www.oie.int/esp/es_index.htm

18. École Normale Supérieure de Lyon, FR. 2007. Descripción de una PCR (en línea). Francia, ENS Lyon. Consultado 7 oct. 2008. Disponible en <http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/principe/anim/presentation.htm>

11. Anexo



Ministerio de Desarrollo Agropecuario
DIRECCION NACIONAL DE SALUD ANIMAL
Laboratorio de Diagnóstico e Investigación Veterinaria

Comité de Bioseguridad

Reporte de Accidentes y Emergencias

Caso No. _____ Fecha del Reporte: _____

Sección: _____ Unidad: _____

Área: _____ Otros: _____

Datos del accidente, emergencia o situación de riesgo:

Fecha: _____ Hora: _____

Descripción del evento:

Testigo (s) del evento: _____

Elementos involucrados en el evento: _____
(Artículos, reactivos, equipos, otros)

Número de personas afectadas: _____

Nombre(s) de la(s) personas afectadas: _____

Incapacidad por causa del evento: No: Sí Días: _____

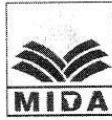
Comentarios: _____

Acciones tomadas frente al evento: _____

Reportado por: _____ Firma del Empleado: _____

Oficial de Bioseguridad: _____

Este formulario debe ser llenado a brevedad posible y remitido al Jefe(a) del Laboratorio, con copia al Oficial de Bioseguridad.



MINISTERIO DE DESARROLLO AGROPECUARIO
DIRECCION NACIONAL DE SALUD ANIMAL
Programa de Sanidad Acuicola

**FORMATO DE INSPECCIÓN DE INOCUIDAD PARA ESTABLECIMIENTOS
DE PRODUCCIÓN ACUÍCOLAS**

Establecimiento:		RUA			-			-					Fecha:
Teléfonos:		Fax:					E mail:						
Representante Legal:													
Teléfonos:		Fax:					E mail:						
Localización del Establecimiento													
Provincia:			Distrito:				Corregimiento:						
Lugar Poblado:			Coordenadas Granja: Vert.:				Horiz.:						
Área Establecimiento:		Poligonal:		ha.		M ²		Producción:		ha.		M ²	
Tecnología producción:		Extensivo:		Semi Intensivo:		Intensivo:		Hiper intensivo:					
Unidades producción: Lagos:				Área Aclimatación: Tinas:				Raceway:					
Especie Cultivada:		Nº de Animales		Procedencia									
				País			Establecimiento						
Otros cultivos acuicola:													
Aspectos Administrativo		6	C	CP	NC	Observación							
▪ Organigrama del establecimiento		1.0	0.5	0.0									
▪ Flujograma del Proceso		1.0	0.5	0.0									
▪ Estatus Legal: - Uso de Tierra		2.0	1.0	0.0									
- Uso de Agua		2.0	1.0	0.0									
Disponib. y Conocimiento de Normas de Higiene/Control Sanitario		4	C	CP	NC	Observación							
▪ Normas y regulaciones oficiales		2.0	1.0	0.0									
▪ Normas internacionales		2.0	1.0	0.0									

Medidas Sanidad/ bioseguridad	21	C	CP	NC	Observación
▪ Servicios Sanitarios/letrinas		2.0	1.0	0.0	
▪ Medidas de higiene					
▪ Personal		1.0	0.5	0.0	
▪ Equipo		1.0	0.5	0.0	
▪ Utensilios		1.0	0.5	0.0	
▪ Programas de educación sobre higiene y seguridad laboral		2.0	1.0	0.0	
▪ Controles y registros de entrada/salida al establecimiento (bitácora)		2.0	1.0	0.0	
▪ Instrucciones para visitantes		1.0	0.5	0.0	
▪ Rótulos y señales de indicaciones		2.0	0.5	0.0	
▪ Sistema de Desinfección		3.0	1.5	0.0	
▪ Animales domésticos en las instalaciones		3.0	1.5	0.0	
▪ Control de Plagas y roedores		3.0	1.5	0.0	
Aspectos Ambientales	7	C	CP	NC	Observación
▪ Conocimiento de las normas y leyes ambientales		1.0	0.5	0.0	
▪ Plan de manejo ambiental		4.0	2.0	0.0	
▪ Programas de capacitación ambiental		2.0	1.0	0.0	
Manejo de Químicos	11	C	CP	NC	Observación
▪ Información actualizada de proveedores		1.0	0.5	0.0	
▪ Fichas técnicas		1.0	0.5	0.0	
▪ Adecuada identificación de los productos		1.0	0.5	0.0	
▪ Registros de entrada y salida de los productos		1.0	0.5	0.0	
▪ Infraestructura de almacenamiento		2.0	1.0	0.0	
▪ Plan de contingencia para enfrentar accidentes		2.0	1.0	0.0	
▪ Registros Sanitarios		1.0	0.5	0.0	
▪ Protección apropiada del manipulador		2.0	1.0	0.0	
Manejo de Alimentos	7	C	CP	NC	Observación
▪ Información actualizada de proveedores		1.0	0.5	0.0	
▪ Fichas técnicas		1.0	0.5	0.0	
▪ Identificación apropiada		1.0	0.5	0.0	
▪ Registros de entrada y salida		1.0	0.5	0.0	
▪ Infraestructura de almacenamiento		2.0	1.0	0.0	
▪ Registros Sanitario		1.0	0.5	0.0	



MINISTERIO DE DESARROLLO AGROPECUARIO
DIRECCION NACIONAL DE SALUD ANIMAL
Programa de Sanidad Acuicola

LISTADO DE CHEQUEO DIARIO EN RECINTO CUARENTENARIO

1. Establecimiento:			2. RUA										3. Fecha:	
4. Áreas Autorizadas para Cuarentenas Activas														
Sala	Tinas	Especie	Nº Animales	Edad/Estadio	Densidad	Lote								
Raceway, Jaulas u Otros														
5. Recinto - pto:0.20			C	CP	NC	Observación								
▪ Condición externa			.10	.05	.00									
▪ Condición interna			.10	.05	.00									
6. Medidas de Bioseguridad - pto:2.00			C	CP	NC	Observación								
▪ Listado personal autorizado			.20	.10	.00									
▪ Restricción de entrada/salida a personal no autorizado			.30	.20	.00									
▪ Vestimenta apropiada del personal autorizado			.20	.10	.00									
▪ Rótulos y señales de indicaciones			.30	.20	.00									
▪ Petates sanitarios			.30	.20	.00									
▪ Atomizadores (desinfección)			.30	.20	.00									
▪ Control de Puertas			.20	.10	.00									
▪ Cortinas de aislamiento			.20	.10	.00									
7. Manejo de Químicos- pto:0.60			C	CP	NC	Observación								
▪ Protección apropiada del manipulador			.30	.20	.00									
▪ Registro Sanitario			.30	.20	.00									
8. Sistema Mant. Registros pto:0.50			C	CP	NC	Observación								
▪ Parámetros			.10	.05	.00									
▪ Biométricos			.10	.05	.00									
▪ Patológicos			.10	.05	.00									
▪ Insumos			.10	.05	.00									
▪ Fichas técnicas de los Insumos			.10	.05	.00									

9. Condición de los animales- ptos: 0.50				C	CP	NC		Observación
▪ Salud				.30	.20	.00		
▪ Evolución morfológica				.20	.10	.00		
10. Manejo de Efluentes - ptos: 0.90				C	CP	NC		Observación
▪ Recambio				.30	.20	.00		
▪ Transferencia				.30	.20	.00		
▪ Cosecha				.30	.20	.00		
11. Tratamientos aplicados								
Producto		Registro sanitario		Dosis			Propósito	
12. Actividades rutinarias								
13. Arribo de Organismos al Recinto cuarentenario								
País		Establecimiento		Especie			Transporte	
							Aéreo	Terrestre
Destino	Sala	Tinas	Cantidad		Densidad	Edad/Estadio	Lote	
Raceway, Jaulas u Otros								
14. Condiciones Llegada ptos:0.30				C	CP	NC		Observación
				.30	.15	.00		
15. Toma muestra (análisis)								
16. Liberación de la cuarentena								
N° Lote		Estadio		Cantidad			Destino	
17. Otras Observaciones:								

Firmas: _____ Técnico del MIDA

_____ Técnico del Recinto Cuarentenario

C: Conformidad-ptos: 5.0 CP: Conformidad Parcial:-ptos: 3.0 NC: No Conformidad -ptos: 0.0
 Acceptable: 90.0 a 100% Bajo Superv.: 70.0 a 89.0% No Aceptable: menos de 70.0%

Anexo No. 5: Listado de chequeo diario en recinto Cuarentenario



MINISTERIO DE DESARROLLO AGROPECUARIO
DIRECCION NACIONAL DE SALUD ANIMAL
DEPARTAMENTO DE EPIDEMIOLOGIA

REGISTRO ACUICOLA		S.A.I.A. N°	
A. UBICACIÓN DEL ESTABLECIMIENTO		B. IDENTIFICACION	
1. Región: _____		6. RUA	
2. Distrito: _____		Provincia Distrito Corregimiento Propietario	
3. Corregimiento: _____		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
4. Lugar Poblado: _____		7. Nombre del establecimiento: _____	
5. Coordenadas:		8. Tipo de establecimiento: _____	
5.1 Vert. _____ Horiz. _____		9. Representante Legal: _____	
		10. Dirección: _____	
		11. Teléfonos: _____	
		12. RUC o Cédula: _____	
C. Encargado del establecimiento: _____			
D. Población Animal			
3. Crustáceos	15. Otros Invertebrados	17. Peces de ornato	18. Otros vertebrados Acuáticos
P. vannamei <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Goldfish <input type="checkbox"/>	Cocodrilos <input type="checkbox"/>
P. stylirostris <input type="checkbox"/>	16. Peces de Cultivos	Gouramis <input type="checkbox"/>	Ranas <input type="checkbox"/>
M. rosenbergii <input type="checkbox"/>	Tilapias <input type="checkbox"/>	Tetras <input type="checkbox"/>	19. Otras especies (Especifique)
Otros <input type="checkbox"/>	Truchas <input type="checkbox"/>	Espadas <input type="checkbox"/>	_____
14. Moluscos	Carpas <input type="checkbox"/>	Mollies <input type="checkbox"/>	_____
Ostras <input type="checkbox"/>	Colossomas <input type="checkbox"/>	Goupies <input type="checkbox"/>	_____
	Cobias <input type="checkbox"/>	Otros <input type="checkbox"/>	_____
Caracoles <input type="checkbox"/>	Pámpanos <input type="checkbox"/>		_____
Otros <input type="checkbox"/>	Corvinas <input type="checkbox"/>		_____
	Otros <input type="checkbox"/>		_____
E. Características generales del Establecimiento Acuicola			
20. Áreas (m²/vol. (ton.) - densidad de siembra (pob/m², pob./vol.)			
Cuarentena _____	Adultos _____	Larvicultivo _____	
Maduración _____	Pre-cría _____	Cuarto de algas _____	
Eclosión _____	Engorde _____	Reservorios _____	
Otros _____			
21. Fuentes de agua: 21.1 Esteros <input type="checkbox"/>	21.2 Pozos <input type="checkbox"/>	21.3 Acueducto <input type="checkbox"/>	21.4 Mar <input type="checkbox"/>
21.5 Recirculación <input type="checkbox"/>	21.6 Represa <input type="checkbox"/>	21.7 Corriente (rio o quebrada) <input type="checkbox"/>	21.8. Otras <input type="checkbox"/>



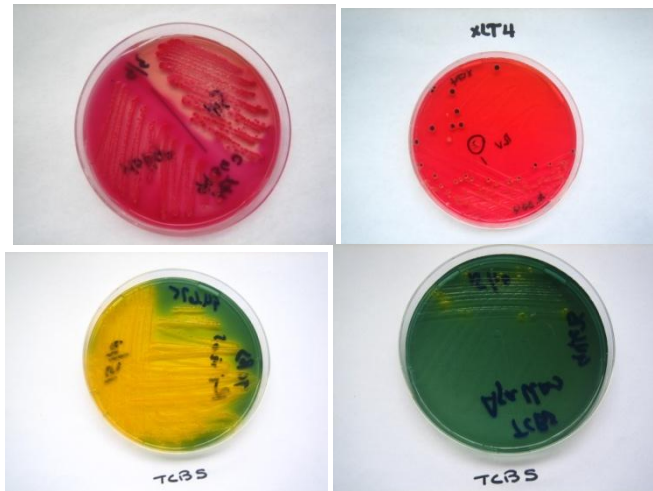
Anexo No. 7: Cobia (*Rachycentron canadum*), antes de la necropsia.



Anexo No. 8: Cobia vista desde otro ángulo, en donde se observan lesiones cutáneas.



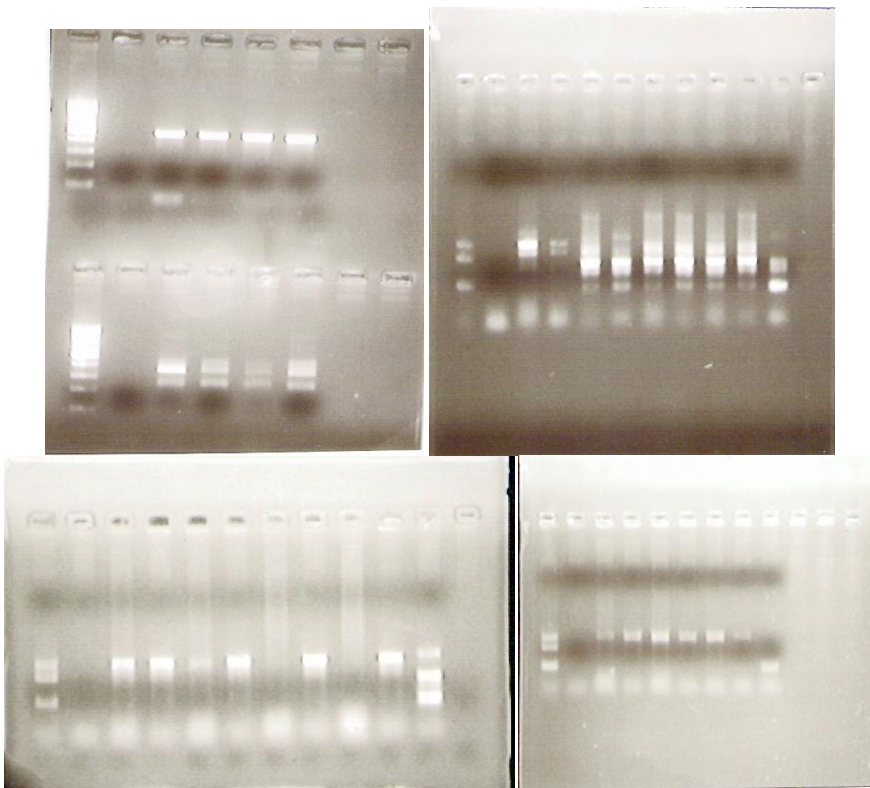
Anexo No. 9: Termociclador utilizado en el laboratorio



Anexo No. 10: Distintos cultivos bacteriológicos



Anexo No. 11: Trucha con deformidad y lesiones cutáneas.



Anexo No. 12: Distintos resultados de una PCR

Présentation de la PCR - Mozilla Firefox

http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/principe/anim/presentation.htm

Más visitados Comenzar a usar Fref... Últimas noticias Customize Links Free Hotmail Windows Marketplace Windows Media Windows

MINISTERIO DE DESARROLLO... OIE - Organización mundial de... Historia de PCR electroforesis la PCR - Buscar con Google Présentation de la PCR

LA PCR ?

TAQ POLYMERASE

AMORCES

ADN

DESOXYRIBONUCLEOTIDES

TUBE

PCR

[accueil] [principe de la PCR] [recherche par thème] [FAQ] [Glossaire] [Liens externes]

Introduction

Une PCR classique se déroule dans un petit tube lui même placé dans un appareil programmable appelé thermocycleur. Le thermocycleur se contente de placer le tube aux températures voulues pendant les durées programmées... et de recommencer en effectuant des cycles. Un cycle reproduit trois températures différentes pendant des durées différentes. La durée d'un cycle est de l'ordre de la minute.

Avant la réaction, tous les « acteurs » de la PCR sont introduits dans le même tube. Il s'agit de l'ADN à amplifier, des oligonucléotides (ou amorces), spécifiques du segment d'ADN voulu, de l'ADN polymérase (ici la Taq polymérase) et enfin du mélange des quatre desoxyribonucleotides constitutifs de l'ADN. Tous sont ajoutés en large excès par rapport à l'ADN.

Terminado

Galeria de fotografías... ya imprimir Octubre 2008 numeracion romana 2... ANEXO 1 pero boletas... Présentation de la PC...

12:39 a.m.

Anexo No. 13: Explicación virtual de la Reacción en Cadena de la Polimerasa
<http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/principe/anim/presentation.htm>